الهندسة الوراثية في الكائنات الراقية

تأليف

دكتور: ج. روجر وار
جامعة يورك

ترجمة

أ.د. هاشم أحمد حسين
أستاذ الوراثة - كلية الزراعة
جامعة القاهرة

١٩٨٦

المحتويات

xxxxxxxxxxxxxxxx

	الصفحة
مقدمة المترجم	
مقدمة السلسلة	
مقدمة المؤلف	
الباب الاول : مقدمة	١
١ ــ ١ استخدام الأنظمة الحية البسيطة فى التجارب الوراثية	
١ــ٢ تكتيكات الوراثة الميكروبية	
١ــ٣ استعمال مزارع الخلايا فى علم الوراثة والبيولوجيا الجزيئية	
الباب الثانى : تهجين خلايا الثدييات	١٣
٢ــ١ استعمال الطوافر فى المزارع الخلوية الراسخة	
٢ــ٢ الاندماج الخلوى والفقد الكروموسومى فى الهجن	
٢ــ٣ رسم خرائط الجينات الآدمية	
٢ــ٤ التطبيقات العملية لخرائط الجينات الآدمية	
الباب الثالث : استخدام الاندماج الخلوى فى انتاج الاجسام الضادة النقية	٢٧
٣ــ١ مقدمة	
٣ــ٢ انتاج الهيبريدومات	
٣ــ٣ بعض استعمالات الاجسام الضادة وحيدة المستمرة	
الباب الرابع : إلتقاط الدن أ الغريب داخل خلايا الثدييات	٣٦
٤ــ١ مقدمة	
٤ــ٢ إلتقاط الكروموسمات الكاملة داخل خلايا الثدييات	
٤ــ٣ شغط الدن أ فى خلايا الثدييات	
٤ــ٤ استعمال ظاهرة التحول فى بحوث السرطان	

الصفحة

الباب الخامس : استزراع الجينات فى خلايا الثدييات	٥٠
٥ـ١ استزراع الجينات فى البكتريات	
٥ـ٢ إلتقاط البلازميدات البكتيرية داخل خلايا الثدييات	
٥ـ٣ الموجّهات الفيروسية لاستزراع الجينات فى خلايا الثدييات	
٥ـ٤ الموجهات المخلّقة صناعيا لاستزراع الجينات فى خلايا الثدييات	
الباب السادس : دمج الجينات فى حيوانات كاملة	٦٢
٦ـ١ مقدمة	
٦ـ٢ استبدال خلايا نخاع العظم فى الحيوانات	
٦ـ٣ دمج الخلايا المزروعة داخل الأجنة	
٦ـ٤ إيلاج الد ن أ فى الأجنة باستعمال الفيروسات	
٦ـ٥ إيلاج الد ن أ فى الاجنة باستعمال الحقن الدقيق	
٦ـ٦ احتمالات المستقبل للعلاج الجينى فى الانسان	
الباب السابع : المعالجة الوراثية للخلايا النباتية	٧٨
٧ـ١ تكنيكات مزارع الخلايا النباتية	
٧ـ٢ التباين الوراثى فى النباتات المتجددة من خلايا	
٧ـ٣ الانتخاب المباشر للطوافر فى المستنبتات	
٧ـ٤ اندماج البروتوبلاستات	
٧ـ٥ دمج جينات جديدة فى النباتات	
الفهرس	٩٢
مراجع لمزيد من القراءات فى مجال الهندسة الوراثية	٩٨

بسم الله الرحمن الرحيم

"مقدمة المترجم"

لم اجد ما اقدم به هذا الكتاب ابلغ مما قاله الخالق العظيم فى كتابه القويم بسم الله الرحمن الرحيم "الحمد لله فاطر السموات والارض جاعل الملائكة رسلا اولى اجنحة مثنى وثلاث ورباع يزيد فى الخلق مايشاء ، ان الله على كل شئ قدير"

صدق الله العظيم

لقد تمكن العلماء فى السنين القليلة الماضية من اجراء دراسات مكثفة لمعرفة خبايا واسرار تنظيم الاطقم الوراثية الراقية . وتشير المعلومات المتوافرة حاليا عن هندسة الجينات ، انه من الممكن فى المستقبل القريب ان يتمكن علماء الهندسة الوراثية من تحوير المعلومات المخزونة فى الجينات والسيطرة عليها بشكل محدد ، وذلك لتخليق طرز وانواع جديدة من الكائنات الحية الراقى منها والدنىء .

لقد شهد النصف الثانى من هذا القرن ثورة علمية هائلة فى علوم الحياة توجها جهود العلماء فى الحقبة الاخيرة بما يسمى الآن "عصر الهندسة الوراثية" الذى يقف على ابواب القرن الحادى والعشرين .

ان آفاق المستقبل فى العلوم الطبية والصيدلانية والزراعية والبيطرية وغيرها من العلوم البيولوجية تتوقف — بشكل لا جدال فيه — على جهود العلماء فى معرفة المزيد عن اسرار الخصائص التركيبية والوظيفية للمواد الوراثية ، وكيفية معالجتها والتحكم فيها لمصلحة ورفاهية الجنس البشرى .

لقد وجدت فى ترجمة الكتاب فرصة لاقدم الى المكتبة العربية جرعة بسيطة من احدث المعلومات عن تكنولوجيا الهندسة الوراثية فى الكائنات العليا ، ورأيت ان يتزود بها كل هاو او محترف لعلوم الحياة . انى ارى الله فى خلقه ، افلا تصدقون ان كنتم فى ريب مما اقول — فلتقرأوا معى هذا الكتاب حتى توقنون .

المترجم

أ.د. هاشم أحمد حسين

مقدمـــة الســـلسلة

لأنه لم يعد فى الامكان لكتاب واحد أن يشمل كل فــروع البيولوجيا ، فإ ن معــهد البيولوجيا قد اقترح هذه السلسلة من الكتب (والتى نحن بصدد واحد منها) حــتى يتمكن المدرســون والطلاب والباحثون والقراء من معرفة التقدم الهائل والمثير فى علوم الحياة. وتبين الاحصاءات تقبل طلاب البيولوجيا سلسلة هذه الكتب بشغف كبير لمعرفــة فروع هــذا العلم .

وتشمل خصائص هذه السلسلة عرض بعض الطرق وقوائم الكتب المقترح قراءتها للــتزود بمعلومات أوسع وعندمــا يكون ممكنــا بعض المقترحــات للتطبيقات العملية .

ويرحب المعهد بمقترحات وتعليقات السادة القراء .

معهد البيولوجيا – لندن
(١٩٨٤)

مقدمـة المؤلـــف

إن التقدم السريع فى علم الوراثــة الجزيئيــة خلال السنوات القليلة الماضية قد أمكــن تحقيقــه لأن علماء الوراثــة قد اختاروا التجريب باستخدام كائنات غايــة فى البساطة . ولقد ركز الباحثون على البكتريات والفيروســات لأنها من الناحيــة الفنية أسهل كثيرا فى تناولهــا عن الكائنات الراقيــة الحيوانية والنباتيــة . وعلى الرغم من ذلك ، توجد اختلافات جوهرية بين البيولوجيا الجزيئية للكائنات بدائيات النوى وحيدة الخلية وتلك الخاصة بالكائنــــات مميزات النــوى عديدة الخلايــا ، ومن ثم فاننا قد نتحصــل على صورة غير كاملة بالتركــيز على الكائنات بدائيات النوى . ويترتب على ذلك أن يعرض السؤال التالى نفسه : هــل هناك وسائل لتطبيق تقنيات الوراثة البكتيرية على الكائنات العليــا الراقية) ؟ ان هــذا الكتاب يعرض امكانيــة استخدام مزارع الخلايا الحيوانية والنباتيــة على اعتبار انها " كائنات

دقيقة شرقية " فى التجارب الوراثية . ونتناول هنا عدة طرق لتكوين توليفات جديدة للمادة الوراثية فى هذه الخلايا . ولقد أدت هذه الدراسات الى امكانية ادخال مواد وراثية جديدة فى كائنات حيوانية ونباتية كاملة . والتقدم المضطرد فى هذه المجالات ، ليس فقط مهما من ناحية التعرف باستفاضة على وراثة الكائنات الراقية ، لكنه ايضا ذو أهمية قصوى من زاوية التقدم الطبى والزراعى .

واخيرا فاننى مدين بالعرفان للدكتور " جون سبارو " على نقده البناء لمسودة هذا الكتاب .

ج . روجر وار

يورك ١٩٨٤

الباب الأول : مقدمة

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

١ ـ ١ : استخدام الانظمة الحية البسيطة فى التجارب الوراثية :

إن أى دارس لتاريخ علم الوراثة يشعر بالدهشة مباشرة عندما يرى علماء الوراثة يستخدمون الكائنات البسيطة كمادة للبحث الوراثى فى تجاربهم . ولقد كان علماء الوراثة الأولون مهتمين أساسا منذ البداية بالآدميين ونباتاتهم وحيواناتهم المستأنسة ، لكن منذ عام ١٩٢٠ كان من المفضل استخدام ذبابة الخل (الدروسوفلا) كمادة للابحاث الوراثية، لما لها من ميزات فنية مفيدة كقصر دورة حياتها وقدرتها على إنجاب اعداد كبيرة من النسل فى بيئة محدودة جدا . ومنذ بدايه حقبة الخمسينات بدأ كثيرون من علماء الوراثة فى استخدام البكتريات وفيروساتها لنفس الاسباب الاساسية السابق ذكرها بالنسبة لذبابة الخل . إن الاتجاه لاستخدام أنظمة حية اكثر بساطة ومرونة من الناحية الفنية مازال مستمرا مع نمو تكنولوجيا الد ن أ المطعم ، حيث يشتمل العمل فى هذه التقنيه على تناول مقاطع فردية من جزئيات الد ن أ .

ولقد كان الاتجاه لاختيار انظمة تجريبية بسيطة لحل مشاكل معقدة ذا فائدة عظيمة لعلماء الوراثة . ومن المؤكد أن التقدم العلمى الحديث فى مجال الوراثة الجزيئية لم يكن من الممكن أن يحدث ، مالم تكن الانظمة التجريبية البسيطة متوافرة . وبالرغم من ذلك ، هناك بعض المعوقات لاستخدام هذه الانظمة البسيطة ـ ويقصد بذلك ، أن الاهتمام لم يعد موجها ناحية الكائنات التى تهم المجتمع ككل على وجه الخصوص .

وحقيقة الأمر أن كثيرا من العلماء يفضلون دراسة الوراثه الجزيئية للآدميين والحيوانات والنباتات الراقية أكثر من مجرد دراسة الوراثة الجزيئية لبكتريات المعى (إ ٠ كولاى) . ولهذا التفضيل أسباب يمكن تقسيمها على نطاق واسع إلى أسباب تطبيقية وأسباب علمية . أما الاسباب التطبيقية فهى أكثر وضوحا وأسهل فى توضيحها :

أولا : إن معرفة الوراثة الجزيئية للحيوانات والنباتات الراقية له أهمية ذات فائدة من الناحية الزراعية . فاذا عرفنا أن أكثر من ٣٠ ٪ من سكان العالم يعيشون دون المستوى الأدنى من الناحية الغذائية ، فان البحث عن سبل لزيادة انتاج الغذاء يجب ان يحظى بكل اهتمام المجتمع العلمى العالمى . وهنا تبرز عدة أسئلة : هل من الممكن اجراء معالجة للمواد الوراثية للحيوانات المستأنسة أو المحاصيل الزراعية بطرق جديدة بحيث نجعلها تزيد محصولها أو مقاومتها لمرضٍ ما ؟ هل من الممكن تحسين القيمة الغذائية للمحاصيل النباتية بالتحويرات الوراثية ، على سبيل المثال ـ عمل تغييرات قد تزيد مستويات الاحماض الأمينية ، ومن ثم ترفع القيمة الغذائية للبروتينات النباتية ؟

ثانيا : إن المعرفة الجيدة للوراثة الجزيئية فى الآدميين ربما تساهم فى علاج بعضا من الأمراض الوراثية فى الانسان ، فكثير من هذه الأمراض فى الآدميين له أساس وراثى بحيث أن المناقشة العملية لعلاج هذه الامراض تعتمد أساسا على تفهم أسبابها . وهناك أيضا أسباب علمية هامة للسؤال المطروح والذى هو : لماذا يجب أن يُوجّه الاهتمام للوراثة الجزيئية فى الكائنات الراقية ؟

إن واحدة من أهم المشاكل التى تتحدى علم البيولوجيا الحديث ـ هى قدرة العلماء على السيطرة على تعبير الجينات أثناء النمو والتكشف . كما أنّ تفهّم السيطرة على تعبير الجين فى البكتريات لا يقدم نقطة بداية ذات قيمة للبحث فى الكائنات الراقية . ولقد أصبح من الواضح تماما ـ أثناء الحقبة الماضية أنه توجد اختلافات جوهرية بين طريقة السيطرة على تعبير الجين فى كل من الكائنات بدائية النوى والكائنات مميزة النوى . وبمعنى أوسع فان النمو يختص بدرجة كبيرة بالكائنات متعددة الخلايا ولا يمكن دراسته إلا باستعمال هذه الكائنات .

وبالرغم من أن الفضول هو الذى يحرك البحث فى مجال علم البيولوجيا لجميع

الكائنات الحية وأن البيولوجيا الجزيئية للبكتريات هى واحدة من أمتع مجالات علم البيولوجى ، إلا أنه توجد رغبة آدمية طبيعية أن تكون مهتمين بوجه خاص بنوعنا والأنواع الحية الأخرى ذات القرابة لنا .

والسؤال الذى يطرح نفسه الآن هو :
كيف يمكن أن نعرف شيئا من البيولوجيا الجزيئية للانسان ونباتاته وحيواناته المستأنسة بعمق مماثل لما هو معروف فى البكتريات ؟

قد يكون من الممكن ـ على الاقل جزئيا ـ ان نوضح هذا التساؤل باستعمال خلايا من الكائنات الراقية منماة فى مزارع لدراستها ومعالجتها تجريبيا من الناحية الوراثية . كما أن علم وراثة الخلايا المستزرعة ينمو بسرعة هائلة وسوف يستمر ذلك فى المستقبل المنظور . والهدف من هذا الكتاب هو أن نقدم لمحة مبسطة عن التقدم الحديث فى مجالات عدة تشمل القواعد الأساسية المشتركة لمحاولة تطبيق تكنيكات الوراثة الميكروبية على وراثة الكائنات الراقية .

وقبل الدخول فى تفاصيل هذا الموضوع يحسن أن تقدم بعضا من المعلومات عن الوراثة الجزيئية الميكروبية والتى قد تفيد القارئ وتعينه على تفهم المعلومات الحديثة المتوافرة عن محاولات تطبيق الهندسة الوراثية فى الكائنات الراقية .

١ ـ ٢ : تكنيكات الوراثة الميكروبية :

ما هى تكنيكات الوراثية الميكروبية القابلة للتطبيق فى الخلايا النباتية والحيوانية المنماة فى مزارع ؟ هناك نقطة واضحة وهى أن مزارع الخلايا هذه لا تحتوى على أى نوع من الحياة الجنسية ، ومن ثم فلن يكون من الممكن استعمال الدورة الجنسية التقليدية لاتحاد الجاميطات المتبادلة مع العملية الميوزية كأساس للتحليل الوراثى .

ومن أجل تكوين توافيق جديدة للمادة الوراثية للدراسة ، فلسوف يكون من الضروري أن يتوفر لنا بعض النظم البديلة للجنس •

لقد واجه علماء الوراثة البكتيرية نفس المشاكل منذ حوالي ٣٠ سنه مضت • فالمادة الوراثية البكتيرية لا تنعزل في صورة كروموسومات طولية الشكل أثناء أي عملية ميوزية ، كما انه لا يوجد أي نوع من الاتحاد بين جاميطات " أحادية " ليعطي نسلا " ثنائيا " • وبالرغم من ذلك ، توجد سُبل عديدة مهمة لاحداث تبادل للمادة الوراثية في البكتيريات •

وأول هذه السبل هو التزاوج الاقتراني Conjugation ، ففي عملية التبادل الاقتراني هذه يمر جزء من المادة الوراثية من البكتريم الواهب الى البكتريم المستقبل (المضيف) على شكل جزئ د ن أ طولي الشكل • وهذا في حد ذاته قد يعتبر عملية جنسية ، بالرغم من أنها لا تشمل اتحاداً بين جاميطات متكافئة • وهذه العملية يبدو أنه لا يوجد مثيل لها في الخلايا الحيوانية والنباتية المنماة في المزارع وسوف لا نتناولها أكثر من ذلك في هذا المقام •

وبالرغم من ذلك توجد طريقتان راسختان منذ زمن بعيد لاستحداث تبادل للمادة الوراثية في البكتريات — قد يكون لهما مثيل في مزارع الخلايا ، وهما عملية التحول الوراثي Transformation وعملية الاستقال Transduction (انظر الجدول رقم ١ — ١) • ففي أثناء عملية التحول الوراثي يتحرر د ن أ بواسطة تحلل الخلايا الواهبة ويؤخذ بواسطة الخلايا المستقبلة • وفي هذه الحالة فان شظايا صغيرة من الد ن أ قد تندمج في د ن أ الخلية المضيفة (المستقبلة) مما يترتب عليه تغيرا في تركيبها الجيني ومظهرها • وهنا لا يتطلب الامر اتصالا بين خلية واخرى •

وفي عملية الاستقال Transduction فان مقطعا من د ن أ الخلية

جدول ١ ـ ١ :

طرق تكوين التبادل الوراثي في الكائنات الدقيقة والتي قد تطبق في الخلايا الحيوانية والخلايا النباتية .

في البكتريات :

* التحول الوراثي :

د ن ا حر ينقل من خلايا واهبة الى خلايا مستقلة .

* الاستنقال :

د ن أ ينقل من خلايا واهبه إلى خلايا مستقبلة من خلال وسيط ڤيروسي (بكتريوفاجات)

* استزراع الجينات :

يولج الد ن أ في مُوجِّه ، وبعد ذلك يولج المُوجِّه في خلايا بكتيرية . والمُوجِّه عبارة عن جزيء د ن أ صغير قادر على التناسخ .

في الفطريات :

* الدورة بديلة الجنس :

إلتحام خيوط الهيفات ـ يُتْبَع باندماج النوى ثم يلي ذلك فقد كروموسومي اثناء الانقسامات الميتوزية .

الواهبة يُحَل إلى خلية بكتيرية مستقبلة من خلال الغلاف البروتينى لڤيروس بكتيرى (عادة ما يسمى البكتريوفاج أو الفاج) . والنتيجة مرة أخرى هى نقل شظية من الد ن أ من بكتريم واهب إلى د ن أ بكتريم مستقبل (من خلال وسيط ڤيروسى كوسيلة نقل) مما يترتب عليه أيضا تغيرا فى التركيب الوراثى للخلية المستقبلة .

والطريقة الرابعة (وقد عمت بدرجة كبيرة فى الوقت الحالى) لتكوين توافيق جديدة للمادة الوراثية فى الخلايا البكتيرية هى استزراع الجينات. وهذه تشمل مقاطع من الد ن أ (ربما من كائنات تتبع أنواعا ليست بينها قرابة وراثية) تُولَج فى جزيئات د ن ا (موجهات Vectors) لها القدرة على التناسخ داخل الخلايا البكتيرية . وهذه الموجهات (الناقلات) ربما تكون على شكل دوائر لا كروموسومية من الد ن أ تسمى البلازميدات Plasmids أو الد ن أ الڤيروسى .

إن إيلاج د ن أ جديد (أو الجينات المراد استزراعها) فى المُوَجِّه يمكن أن يحدث داخل المختبر باستعمال تكنيكات بيوكيميائية لقطع وإعادة لحام جزيئات الد ن أ . وهذه العملية فى جملتها يطلق عليها " تكنولوجيا الد ن أ المطعم " ولكون الموجِّه يتناسخ فى حد ذاته ومعه مقطع الد ن أ المُولَج ، فان أعداد كبيرة من نسخ الد ن أ المُولَج (وأحيانا كميات كبيرة من البروتين المُسَيْطر عليه شفريا بهذا الد ن ا) يمكن الحصول عليها بهذه الطرق .

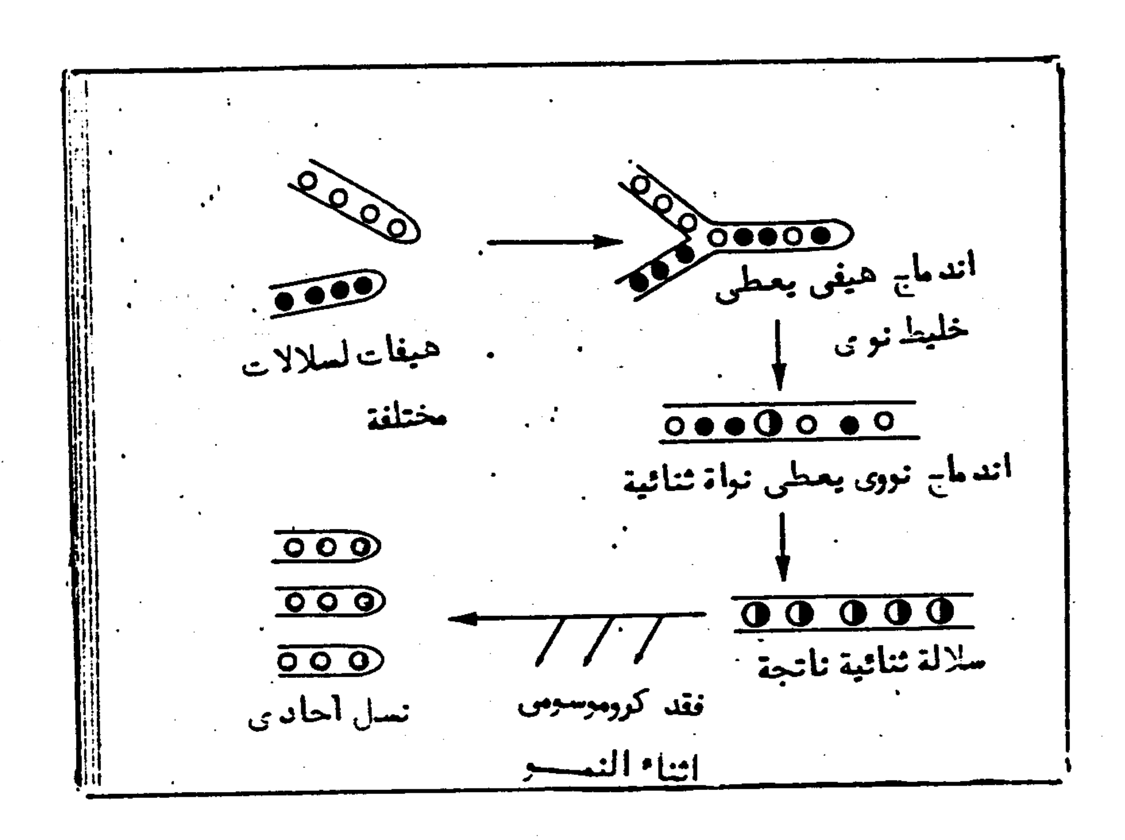
والميكانيكية الاخيرة لتحصول على تبادل للمواد الوراثية فى الكائنات الدقيقة والتى يجب أن تؤخذ فى الاعتبار ـ لا تشمل البكتريات ، لكنها تحدث فى الفطريات مثل فطر الاسبرجلس نيديولانز Aspergillus nidulans. والتتابع الكلى للأحداث يطلق عليه اسم الدورة بديلة الجنس Parasexual cycle , (الشكل ١ ـ ١). وقد تحدث هذه الدورة لو أن سلالتين مختلفتين وراثيا من نفس النوع نميتا معا . فأحيانا تلتحم الهيفات معطية ما يسمى بخليط النوى Heterokaryon (حيث طرازان

مختلفان وراثيا من النوى يتواجدان معاً في سيتوبلازم مشترك) • ومن خلال ذلك قد يندمج بعض النوى لمضاعفة الهيئة الكروموسومية • وتتوافر حاليا طرق (تكنيكات) لعزل مزارع من الفطر الذى حدث به ذلك • ونوى فطر الاسبرجلس عادة أحادى المجموعة الكروموسومية ، ولذلك فالسلالة الجديدة الناتجة بواسطة اندماج النوى تكون ثنائية.والهيئة الكروموسومية لمثل هذه السلالات الثنائية من الاسبرجلس ليست ثابتة،وفى اثناء الانقسام الميتوزى (لاحظ ليس الميوزى) لا تتحرك بعض الكروموسومات ناحية أقطاب الخلية وتُفقَد بالتدريج حتى يتحول العدد الكروموسومى الى العدد الأحادى ثانية • وسلالات " النسل " الناتجة من الاسبرجلس تحتوى على نفس كمية (وليس نوع) المادة الوراثية التى كانت موجودة فى كلا السلالتين الأبويتين ولكن بتوافيق جديدة • وعندما يُجرى تحليل وراثى للنسل الناتج من هذا " التلقيح بديل الجنس " ' parasexual cross ' ،فان ذلك يؤدى للحصول على معلومات عن التنظيم الجينى فى الكروموسومات •

١ ـ ٣ استعمال مزارع الخلايا فى علم الوراثة والبيولوجيا الجزيئية :

إن الخطوة الأولى فى تطبيق تكنيكات الوراثة الميكروبية على الكائنات الراقية تتطلب البحث عن سبل للتعامل مع خلاياها بطريقة مماثلة لتلك المستعملة فى الكائنات الدقيقة • ومن حسن الحظ أنّ التكنيكات الخاصة بمزارع الخلايا الحيوانية والنباتية قد اكتشفت وطورت منذ بعض الوقت ، كما أنّ كثيرا من المعلومات المعروضة فى هذا الكتاب تشمل تطبيقات لتكنيكات وراثية فى خلايا منماة فى مزارع خلوية • إن تكنيكات مزارع الخلايا النباتية والحيوانية معروضة باسهاب فى كثير من المراجع العلمية المتخصصة (أنظر شارب ١٩٧٧ ، ويتشر وانجرام ١٩٧٦ ورايتوت وباجاج ١٩٧٧) •

بعض الخصائص الأساسية لمزارع الخلايا الحيوانية :



الشكل ١ ــ ١ : الدورة بديلــة الجنس فى فطر الاسبرجلس ٠

من الأهميـة بمكان أن تلاحـظ الفرق بين المزرعـة الخلوية الأوليـة Primary والمزرعـة الخلوية الراسـخة Established للخلايا الحيوانيـة . ففى البداية عنـدمـا تعزل خلايا من أنسـجة آدمية أو غيرهـا من كائنـات ثديية وتوضـع فى بيئـة استزراع ، فانهـا عادة ما تدخل فى عمليـة إنقسام حوالى ٢٠ مرة قبـل أن تتوقف عـن النمـو . وهذه المزارع الأوليـة والتى لها فترة حيـاة محدودة تعرف باسم " مـزارع الخلايا الأولية Primary cell cultures . ومن حين لآخر قد ينتـج خط خلـوى cell line من مزرعة خلويـة أولية له فترة حيـاة غير محدودة يمكـن اسـتزراعة إلى ما لا نهاية مثل أىّ كائن دقيـق . ويطلق على ذلك لفظ " المزرعـة الخلويـة الراسخة Established cell culture " أو " خط خلـوى Cell line . ويمثل هـذا طراز المزارع المستعملة فى معظم الموضوعات الـتى سنتناولهـا فى الأبواب اللاحقـة . (إن طبيعة التغـير من المزرعـة الخلوية الأوليـة إلى المزرعـة الخلوية الراسـخة مازال غير واضـح ، وربما يكون لها بعض الخصائـص المشـتركة لبعض أطوار النمـو الأولى للخلايا السـرطانية) .

إنّ الأوجـه العامة للتشـابه والاختلاف بين العمـل مع البكتريات ومـزارع الخلايـا الحيوانية الراسـخة تستحق أن تؤخذ فى الاعتبـار :

١) فالاختلاف الواضح بين الاثنـين ـ عندما يستزرعان فى صحاف بترى Petri dishes هو أن البكتريات تَنْمُـو على سطح بيئـة مجمدة بالآجار ، لكن الخلايا الحيوانيـة تنمى معلقـة على سطح زجاجى أو من البلاسـتيك ، وتنسل فى بيئة سـائلة .

٢) كما أن معدل النمو للخلايا الحيوانيـة أبطأ كثيرا (زمـن التضاعف من ١٠ إلى ٢٠ سـاعة بالمقارنـة بـ ٢٠ إلى ٦٠ دقيقـة فى البكتريات) .

٣) كما أن بيئـة الاسـتزراع لها يجب أن تكـون أكثر غنى من الناحيـة الغذائيـة

(أساسا بسبب وجود مصل serum مضاف ، والذى يحتوى على عوامل نمو غير محددة بالضبط لكنها ضرورية) . وبالرغم من ذلك ، وبطرق عدة يمكن معالجة مزارع الخلايا الحيوانية الراسخة وكذلك فردها كما لو كانت بكتريات (الشكل ١ ـ ٢) .

وعندما تبين لعلماء الوراثة أن خلايا الثدييات يمكن تناولها مثل البكتريات ، بدأوا دراسة الطرق الممكنة لتبادل المواد الوراثية بين خطوط خلوية cell lines على شكل طراز من التزاوج . وكما سبق أن أوضحنا فى البكتريات ، فإن ذلك لا يحتاج إلى اندماج بين جاميطتين أحاديتين،واتضح بجلاء أنه توجد عدة طرق مختلفة تماما لتكوين تنظيمات من المادة الوراثية فى الخلايا المُنمّاة فى المزرعة . وفيما يلى بعض من هذه التكنيكات سوف نعرضها بصورة موجزة .

أ ـ الاندماج الخلوى Cell fusion:

أحيانا تندمج خلايا الثدييات المناة فى المزارع ثم تدخل فى سلسلة من الأحداث غالبا ما تشبه الدورة بديلة الجنس فى فطر الاسبرجلس (أنظر الجزء ١ ـ ٢). فعقب الاندماج الخلوى ،قد يندمج النوى معطيا ضعف العدد الكروموسومى تقريبا الذى كان موجودا فى الخلايا الأصلية . فلو كانت الخلايا التى تندمج آتية من خطوط خلوية مختلفة ، فلسوف تنتج خلية هجينة.وفى أثناء الانقسامات الميتوزية التى تلى الاندماج ، تفقد بعض الكروموسومات،ويترتب على ذلك تكوين نسل من المستعمرات باعداد كروموسومية مختلفة.وتسمح دراسة المستعمرات الناتجة فى النسل بنوع من التحليل الوراثى فى المزرعة ـ والذى تتولد عنه ثروة هائلة من المعلومات عن تنظيم الجينات الآدمية فى الكروموسومات (انظر الباب الثانى) . إن الاندماج الخلوى الذى يشتمل على طُرز معينة من خلايا منتجة للأجسام المضادة له أهمية خاصة لأسباب أخرى . وهذا التكنيك من تكنولوجيا الهندسة الوراثية يعطى خطوط خلوية هجينة يمكنها إنتاج كميات

هائلة من الأجسام الضادة على درجة عالية من النقاء • وهذا الاكتشاف المثير له أهمية قصوى من الناحية الطبية (أنظر الباب الثالث) •

ب ـ التحول Transformation :

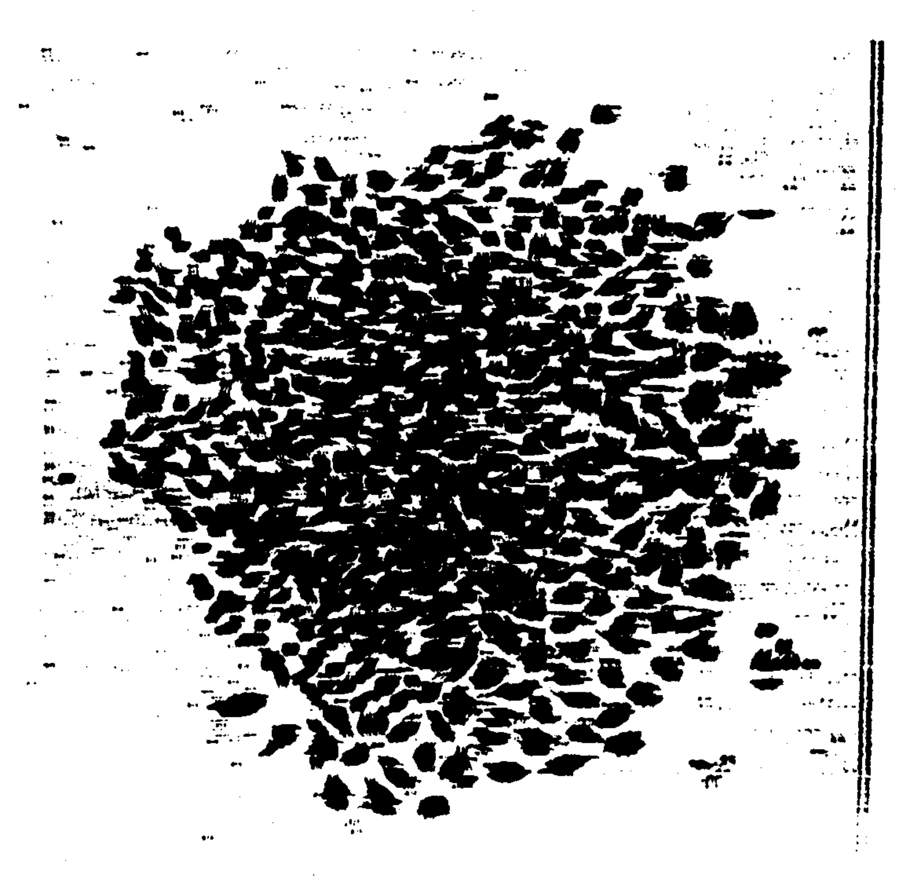
يمكن أن يُولج الد ن أ في الخلايا الحيوانية المستزرعة إما في صورة د ن أ نقي أو على صورة كروموسومات معزولة ، ومن ثم يسمح ذلك باجراء دراسات وراثية مكافئة لعملية التحول في البكتريات (الجزء ١ ـ ٢) • وعملية التحول هذه ثبت حاليا أنها مفيدة للغاية في دراسة بعض المشاكل البيولوجية الأساسية • فعلى سبيل المثال ، تستعمل هذه الطريقة الآن لتوصيف (تشخيص) جينات السرطان الآدمية ، ويعتبر ذلك أهم تقدم جوهري في بحوث السرطان لسنوات قادمة (الباب ٤) •

حـ ـ استزراع الجينات Gene cloning :

يمكن للجينات أن تولج بيوكيميائيا في الد ن أ الخاص بموجهات مستزرعة cloning vectors والتي يمكنها أن تتناسخ في الخلايا الحيوانية. وهذا التكنيك يسمح باجراء استزراع للجينات في الخلايا الحيوانية بطريقة مشابهة لاستزراع الجينات البكتيرية • ولقد فتح ذلك آفاقا علمية وتطبيقية واسعة (الباب الخامس) •

إن التكنيكات التي أشرنا إليها سالفا يمكنها إنتاج هيئات كروموسومية في خلايا منماة في مستنبتات • وحديثا تزايد الاهتمام بامكانية دمج مواد وراثية جديدة في حيوانات كاملة ومن الممكن أيضا في الادميين • ويترتب على ذلك نتائج غاية في الأهمية في مجال تربية الحيوان ـ وقد يؤدى ذلك إلى معالجة الجينات الخاصة بأمراض وراثية آدمية (الباب ٦) •

ومستنبتات الخلايا النباتية يمكن تناولها بطرق عدة – وهي مشابهة بدرجة كبيرة – وإن كانت تختلف جوهريا – للتكنيكات المستعملة في دراسة مزارع الخلايا الحيوانية . والاختلاف الأهم هو أن نباتا كاملا يمكن أن يتولد من خلايا معالجة في مستنبت ، وهذا له تطبيقات عملية في الأهمية في مجال تربية النباتات وفي الزراعة العملية ((الباب ٧)) .



الشكل ١١ – ١٢ :: مستعمرة من خلايا القيقب الجميزي نامية في طبق بتري من البلاستيك . نشأت المستعمرة من خلية مفردة بعد حوالي تسع دورات من الانقسام .

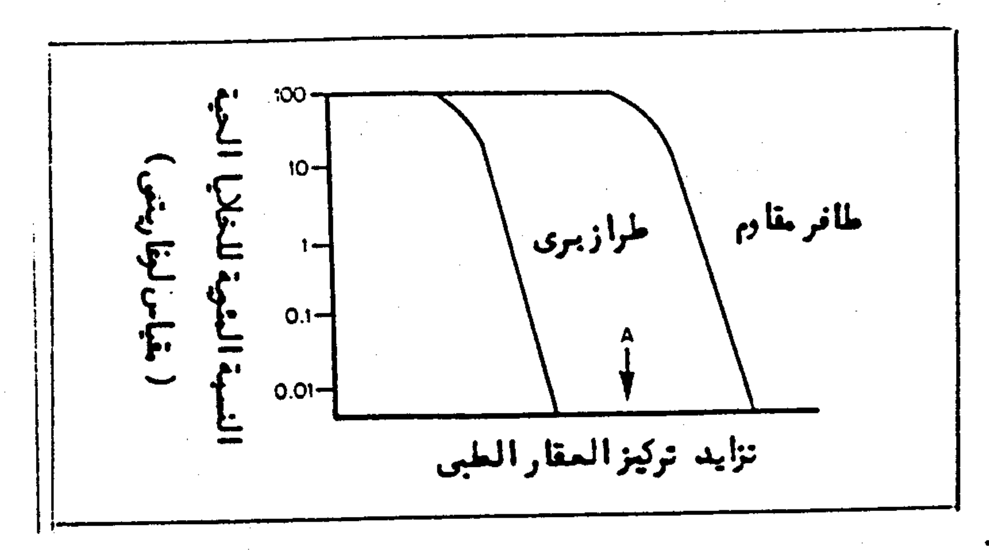
البـــاب الثانـــــى

تهجـــين خلايـــا الثدييـــات

٢ ـ ١ استعمال الطوافر فى المزارع الخلوية الراسخة :

لكى يتمكن مهندسوا الوراثة من إجراء تحليل وراثى لخلايا الكائنات الثديية النامية فى مستنبتات خلوية ، فإن الأمر يتطلب توافر مجموعة من الطوافر لدراستها . فعلى سبيل المثال لو كانت جميع نباتات البسلة التى درسها مندل ذات إرتفاع متماثل ، لما تمكّن مندل من دراسة توارث هذه الصفة . لكن عندما هَجّن مندل نباتات البسلة طويلة الساق ، فقد تمكن من الحصول على معلومات ذات أهمية عن التوارث للجينات المسيطرة على إرتفاع النبات . ولنفس السبب ، فإن مناقشة المعالجة الوراثية لخلايا الثدييات تتطلب الأخذ فى الاعتبار طبيعة ونشأة الطوافر الناتجة فى مزارع (مستنبتات) الخلايا .

وكثير من فئات الطوافر المستعملة فى وراثة خلايا الثدييات تماثل تلك التى وجدت فى البكتريات ، وفى كلتا الحالتين من المحتمل أن أسهل الطوافر التى يرغب الباحث فى عزلها هى تلك التى بها مقاومة متزايدة لأحد العقاقير الطبية المعينه (الشكل ٢ ـ ١) . فعندما تفرد خلايا " الطراز البرى " العاديه فى بيئات متزايدة التركيز من هذا العقار الطبى ، فانه يمكن الحصول على منحنى القابلية للحياه . فالطوافر التلقائية القادرة على النمو عند تركيزات من العقار الطبى تقتل الطراز البرى من الخلايا قد تظهر من بين خلايا المزرعة (بتكرار حوالى 10^{-6} = ١ فى المليون ، إلا أن هذا التكرار قد أمكن زيادته بعد معاملة الخلايا بالمطفرات الكيميائية) . وهذه الطوافر المقاومة يمكن عزلها من عشيرة الخلايا العادية بواسطة تفريد أعداد كبيرة من الخلايا (مثلا 10^{7}) فى تركيز مناسب من العقار الطبى (التركيز A فى الشكل ٢ ـ ١) .



الشكل ٢ ــ ١ :

منحنيات القابلية للحياه لخلايا الطراز البرى (يسار) وخلايا طافر مقاوم (يمين) فردت تحت ظروف تركيزات متزايدة من عقار طبى · التركيز A يمثل تركيز عقار قد يستعمل فى انتخاب طوافر مقاومة ·

OH
N N N H
H_2N
جوانين

OH
N N N N H
H_2N
آزاجوانين

الشكل ٢ ــ ٢ :

التركيب الفراغى للجوانين ، وهو أحد المكونات العادية للـ د ن ا ، وكذلك التركيب الفراغى لنظيره الأزاجوانين ·

والمثال الواضح الذى يمكن أن نسوقه هنا هو المقاومة لعقار "الأزاجوانين" (azaguanine) والذى استعمل على نطاق واسع فى احتراز الخلية ، وكما سوف نناقش فيما بعد ، فان هذا العقار له خصائص عديدة جعلت له فائدة خاصة فى دراسة وراثة خلايا الثدييات . ومادة "الأزاجوانين" هى أحد نظائر البيورين وهو الجوانين (الشكل ٢ـ ٢) .

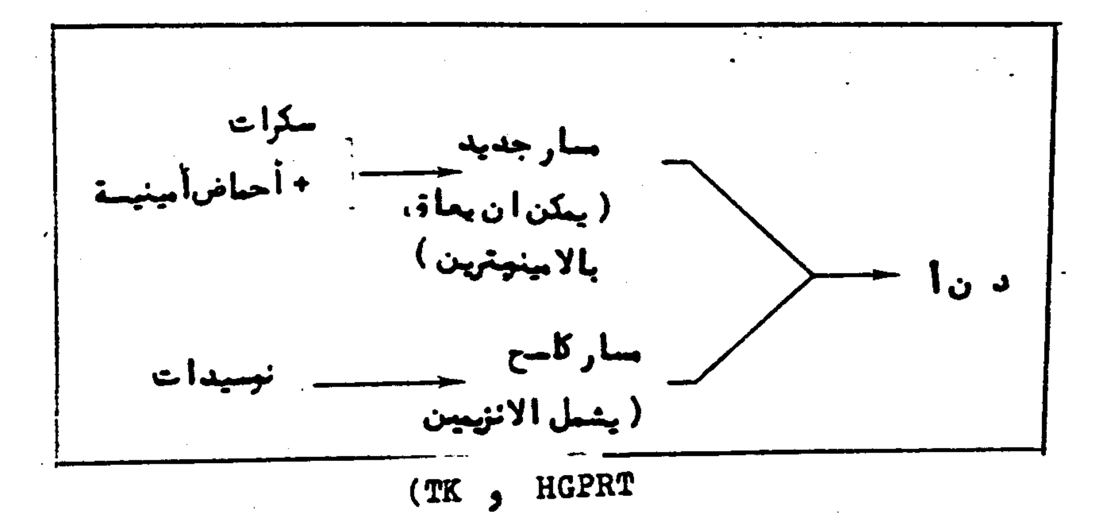
فلو تواجد "الأزاجوانين" فى بيئة النمو فان الخلايا سوف تُولجه فى الـ د ن أ الخاص بها ، ويؤدى ذلك إلى قتلها . وأحد الانزيمات المتداخلة فى تتابع هذه الأحداث يسمى "إنزيم الهيبوزانثين ـ جوانين فوسفور يبوسيل ترانسفريز" ، ويرمز له بـ HGPRT للاختصار . وهذا الانزيم عادة ما يحوّل البيورينات (كالجوانين مثلا) الى نوتيدات (مثل جوانوزين أحادى الفوسفات) ، وهذه تستعمل بعد ذلك لتخليق الـ د ن أ . أما فى الخلايا المقاومة للازاجوانين ، فإن هذا الانزيم له تركيب مختلف يمنعه من القيام بوظيفته العادية ، ويترتب على ذلك أنّ الازاجوانين لا يُولَج فى د ن أ الخلايا . ومن ثم فالخلية الطافرة تكون قادرة على الحياة فى وجود الأزاجوانين . كما أنّ نقص انزيم الـ HGPRT لا يكون مميتا للخلية وذلك لأن له مساران لتخليق النوتيدات :

"المسار الكاسح" والذى سبق شرحه ، "ومسار بديل" وهذا يشمل التخليق من جديد لهذه النوتيدات من السكرات والأحماض الأمينية (الشكل ٢ ـ ٣) .
(الأزاجوانين لا يمكنه أن يُولَج فى الـ د ن أ عن طريق المسار الثانى) .

وبالمثل يشاهد نفس القصور البيوكيميائى فى مرض وراثى آدمى يسمى تناذر "ليش ـ نيهان" (Lesch - Nyhan) . فالأفراد المصابون بهذا المرض ينقصهم إنزيم HGPRT ولديهم قدرة متزايدة لتخليق البيورين من جديد . ويؤدى هذا النوع من التمثيل الغذائى الشاذ إلى أعراض إكلينيكية كالرعشة وتأخر النمو وعدم السيطرة على تحريك الأطراف. كما أن الأفراد المصابين لديهم تشوه ذاتى (بواسطة عض الشفاة والأصابع) .

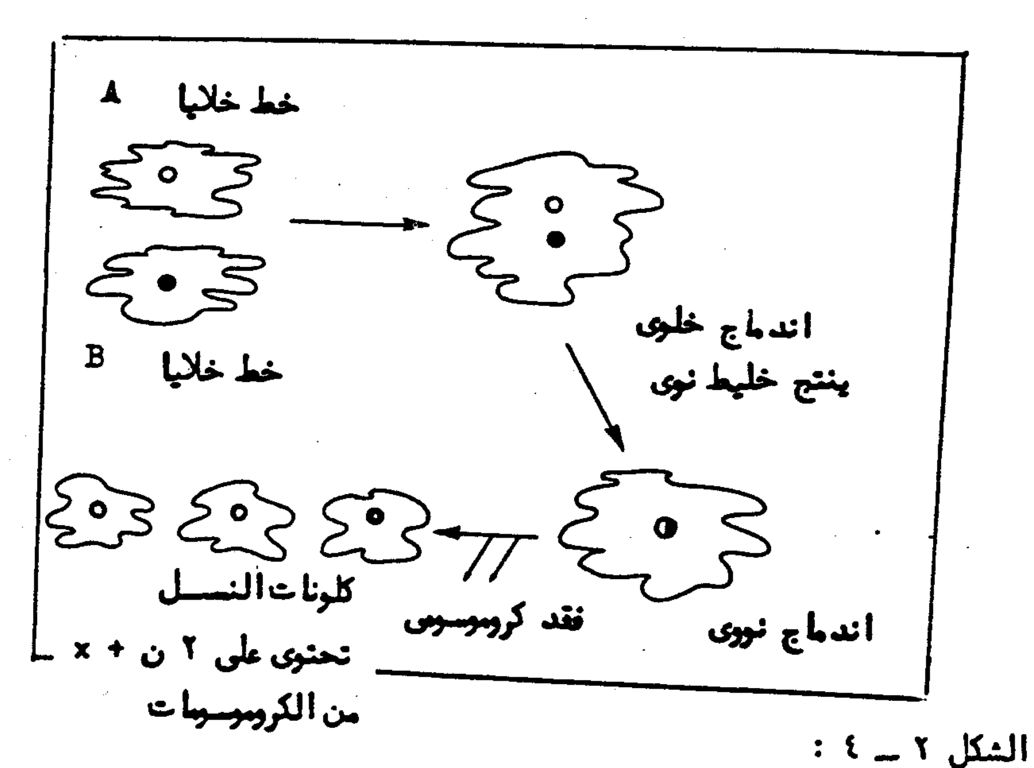
بالرغم من أن الطوافر المقاومة هى الأسهل فى العزل فى مزارع الخلايا ، إلا أنه توجد طرز أخرى ذات فائدة . فالطوافر التى لها إحتياجات إغذائية إضافية تمثل فئة ذات أهمية . فعلى سبيل المثال ، بالرغم من أن خلايا الفأر (الهامستر) فى المزارع الخلويه لا تتطلب عادة تواجد الحمض الأمينى " برولين " فى بيئة نموها ، إلا أنه يمكن عزل طوافر لها مثل هذا الاحتياج الاغذائى ، وذلك لأنها قاصرة فى إنزيم يتدخل فى التخليق الحيوى للحمض الأمينى " برولين ". كما يمكن أيضا عزل طوافر أخر لها إحتياجات لمغذيات أخرى لا تحتاج إليها عادة الخلايا النامية فى المستنبتات .

وقد تحير علماء الوراثة - لبعض الوقت - فى واحدة من الخصائص العامة للطفرات فى مزارع خلايا الثدييات . ففى علم الوراثة التقليدى للكائنات العليا - ينظر للطفرات على أنها متنحية أو سائدة . وفى معظم الأحيان تكون النسخة الطافرة للجين (الأليل الطافر) متنحية لنسخة للطراز البرى (الأليل البرى) . وسوف يتضح فى كثير من الموضوعات التى سنتناولها فيما بعد ، أنه عندما تندمج خلايا الثدييات (الجزء ٢ - ٢) ، أو عندما يتم نقل الجينات فى مزارع الخلايا (الأجزاء ٤ - ٢ و ٤ - ٣) عادة ما تكون الأليلات الطافرة متنحية ، كما هو متوقع . وبالرغم من ذلك ، يبدو أن هناك تناقضا ، لأنه فى البداية عندما تعزل الطفرات من مزارع الخلايا ، فان هذه الطفرات المتنحيه سوف تعزل فى خلايا ثنائية . والسؤال المطروح هو : لماذا لا تقنّع هذه الطفرات بواسطة الأليلات البرية السائدة والتى من المتوقع أن تكون موجودة على الكروموسومات النظيرة ؟ والآن يتضح أن بعض الطفرات (وضمنها المقاومة للازاجوانين) تكون فى كروموسوم X ، حيث توجد منها نسخة واحدة فى خلايا الذكر، كما أن نسخة واحدة منها تكون فعالة فى خلايا الأنثى (والنسخة الأخرى تكون متكاثفة وفى حالة غير فعاله وتسمى جسم بار (Barr Body) ، ومن ثم فمشكلة السيادة لا تظهر . وفى بعض الأحيان فإن التفسير هو أنّ هذه الخلايا فى المزارع الخلوية الراسخة عادة ما تكون قد فقدت بعض المقاطع الصغيرة من بعض



الشكل ٢ ـ ٣ :

المسارات البديلة لتخليق النويدات في خلايا الثدييات ٠ طوافر المقاومة للأزاجوانين وهي قاصرة في إنزيم الـ HGPRT ، ومن ثم لا يمكنها إيلاج جينه في الد ن ا الخاص بها بواسطة مسار التخليق الكاسح " Scavenger " .



الشكل ٢ ـ ٤ :

الدورة بديلة الجنس في مزارع خلايا الثدييات ٠ للايضاح أنظر التفاصيل داخل الموضوع ٠

الكروموسومات ومن ثم لو ان طفره ظهرت فى منطقة مقابلة للكروموسوم النظير ، فسوف لا تظهر مشكلة السيادة مرة أخرى حيث توجد فقط نسخة واحدة من الجين الموجود .

ولقد اقترح علماء الوراثة تفسيرات أخرى أكثر تعقيدا .

٢ ـ ٢ : الاندماج الخلوى والفقد الكروموسومى فى الهجن :

النموذج الأول للتحليل الوراثى فى مزارع الخلايا والذى يجب أن يؤخذ فى الاعتبار فى هذا المقام موضح تخطيطيا فى الشكل (٢ ـ ٤) ويسمى هذا النموذج أحيانا " بالدورة بديلة الجنس " . وهو إلى حد ما مماثل للدورة بديلة الجنس فى فطر الأسبرجلس (أنظر الجزء ١ ـ ٢) ، ولكن توجد بعض الاختلافات الهامة فى طريقة فقد الكروموسومات فى النواة الهجينة .

فعندما ينمى معا خطان للخلايا cell lines فى نفس وعاء المزرعة ، قد يحدث اندماج خلوى (الشكل ٢ ـ ٥) واندماج نووى لانتاج خط خلوى بهيئة كروموسومية مشتركة . ويمكن أن يحدث الاندماج بين خلايا من نفس النوع أو من أنواع مختلفة . فلو كان الاندماج الخلوى الأولى بين مزرعة خلوية أولية لنوع ما ومزرعة خلوية راسخة لنوع آخر ، فقد يحدث فقد سريع لبعض الكروموسومات من الخليه الهجينة اثناء الانقسامات الميتوزية التالية إلى أن تثبت المستعمرات (الكلونات) بهيئة كروموسومية اعلى نسبيا من المستوى الثنائى (٢ ن + س ، حيث " ٢ ن " العدد الكروموسومى الثنائى و "س" عدد قليل). وسوف نناقش فيما يلى تفاصيل هذه العملية واستعمالاتها فى وراثة الانسان .

لقد أمكن روية خلايا عديدة النوى فى الفقاريات منذ أكثر من ١٠٠ عام . ولقد أمكن روية هذه الخلايا بوجه خاص ـ وبنسبة عالية أثناء العدوى بالفيروسات ، مثل عدوى اللوزات اثناء الاصابة بالحصبة .

ولقد أمكن أيضا روية الخلايا عديدة النسوى فى مزارع الأنسجة منذ فترة من الزمن. فمنذ عام ١٩٥٤ ، قد تبين أن فيروسات الحصبة وفيروسات الغدة النكفية والانفلونزا تسبب اندماجا خلويا فى مزارع الأنسجة • وفى عام ١٩٦٠ أوضح ج • باريسكى أن المزارع المختلطة لنوعين من الخلايا تحتوى على خلايا هجينة ، حيث نواتان لنوعين مختلفين قد اندمجتا معا لتعطيان نواة واحدة ، حاملة لكروموسومات كلا نوعى الخلايا • وبعد ذلك مباشرة أمكن للعالم ب • إفروسى تنمية خطوط خلايا هجينة نقية فى مستنبتات خلوية • وفى عام ١٩٦٥ تمكن كل من هـ • هاريس وج • اف • ويتكتر من عزل هجن تكونت بين خلايا مشتقة من نوعين مختلفين (على سبيل المثال ، خلايا الفأر وخلايا الانسان) • وهذه الملاحظة المثيرة لها أهمية خاصة فى وراثة الانسان ، كما سيتضح فيما بعد •

ويندمج عدد قليل من الخلايا مع بعضه فى خليط من طرازين مختلفين ، ومن ثم فقد صممت تكنيكات لتحقيق مايلى :

أ- زيادة عدد الاندماجات الخلوية •

ب- انتخاب الهجن النادرة من مخاليط الخلايا الابوية •

وأكثر الطرق استعمالا لمزيادة تكرار الاندماجات الخلوية يتلخص فى تعريض مخاليط من الخلايا لفيروس ساندای (أحد مجموعة فيروسات الانفلونزا) المثبط بالأشعة ما فوق البنفسجية • ويبدو أن الفيروس يطمر نفسه فى أغشية الخلايا المتجاورة مفضلا تحليلها ، ويترتب على ذلك تكون قنوات سيتوبلازمية بين هذه الخلايا المتجاورة • وأيضا يمكن أن يحدث الاندماج الخلوى بتعريض الخلايا لفترة قصيرة لمادة البولى إيثلين جلايكول •

ويمكن أن يتم إنتخاب الهجن النادرة من الزيادة الكبيرة فى الخلايا غير المندمجة باستعمال بيئات نمو تسمح فقط للخلايا الهجينة بالبقاء على قيد الحياة • واحدى البيئات التى تستعمل على نطاق واسع هى المسماه بتكنيك انتخاب هات HAT selection والذى اكتشفه العالم ج • ليتلفيلد • وفى هذا النوع من الانتخاب يكون أحد خطوط

الخلايا الأبوية مقاوم للأزاجوانين ، ومن ثم فينقصه الانزيم HGPRT (انظر ص ١٥).
أما خط الخلايا الآخر والذى يُرمز إليه بـ TK فينقصه إنزيم مخالف فى " المسار الكاسح " لتخليق النوتيدات ، وهو إنزيم الثيميدين كينيز . ويترتب على ذلك أنّ كلا من سلالتى خط الخلايا لا تكون قادرة على استعمال بادئات الد ن ا (مثلا الهيبوزانثين أو الثيميدين) فى البيئة المستعملة لتخليق الد ن ا ، من خلال المسار الكاسح ويضاف للبيئة عقار طبى يسمى "الأمينوبترين" وهو مثبّط للمسار الجديد de novo pathway (انظر الشكل ٢ ـ ٣) . والتاثير النهائى للطفرات وللعقار الطبى هو أن كلا خطى الخلايا الأبوية لا يمكنه النمو فى "بيئة" HAT (بيئة محتوية على هيبوزانثين وأمينوبترين وثيميدين) . ولو حدث إندماج خلوى ، فان كل طراز خلوى أبوى سوف يساهم بنسخة برية الطراز من الجين الذى يكون منقصا للنسخة الأخرى ـ فى الهجين الناتج . ومن ثمّ ، فالطافر الذى يكون TK^- يحمل جينا فعّالا للانزيم HGPRT والطافر الآخر الذى يكون $HGPRT^-$ (سالب لهذا الانزيم) يحمل جينا فعّالا للانزيم TK .

ويترتب على ذلك أن الهجين يكون خليطا للجين الخاص بالانزيم HGPRT (أى $HGPRT^+/HGPRT^-$) ، وايضا خليطا للجين TK (اى يكون TK^+/TK^-) ولكون الجينات الطافرة متنحية فان الهجين يحمل مظهر الطراز البرى (مثلا مسار كاسح فعّال) ومن ثم فيمكن للخلايا الهجينة النمو فى بيئة هات HAT كما يمكن عزلها من الخلايا الابوية التى لا تنمو .

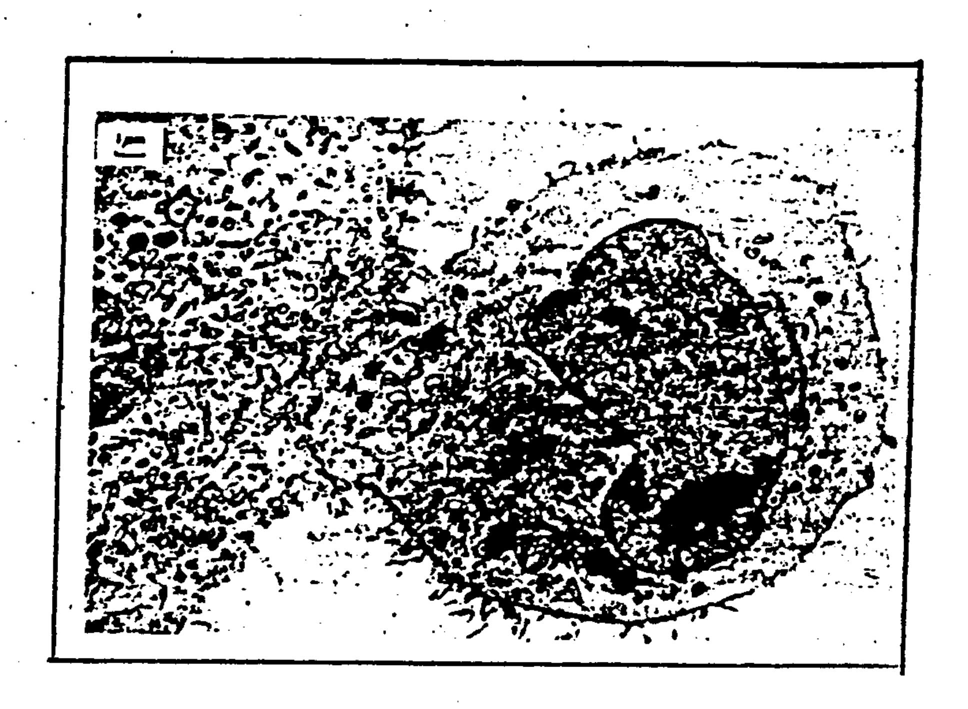
والهجن التى تتكون بين خلايا تابعة لنفس النوع أو بين أنواع شديدة القرابة ، عادة ما تكون أكثر ثباتا . فهى تنقسم خضريا ، وحدث أحيانا فقد لبعض كروموسوماتها. بالرغم من ذلك فقد أوضحت العالمة مارى وايس Mary Weiss عام ١٩٦٧ ملاحظة هامة ومثيرة ، وهى أن هجن خلايا "الانسان ـ الفار" قد فقدت كروموسوماتها بسرعة عالية . وعلاوة على ذلك ، فان الكروموسومات الآدمية هى التى فقدت تفضيليا ،

ولذلك فبعد ٢٠ جيلا خلويا احتوت الهجن على جميع كروموسومات الفار وفقط ٢ إلى ١٥ من الكروموسومات الآدمية • ويستمر الفقد التفضيلى للكروموسومات حتى بعد ١٠٠ إلى ١٥٠ جيلا من الخلايا • ويحدث الثبات عندما يبقى ١ إلى ٣ كروموسومات آدمية مع كل كروموسومات الفأر (ويحدث فقد تفضيلى مماثل للكروموسومات من أحد الأنواع فى الهجن النوعية الأخرى) وتحتوى خطوط خلايا مختلفة (او كلونات = مستعمرات) ناشئة يمثل هذا التتابع من الأحداث ، على كروموسومات آدمية مختلفة • ويجب أن يُفهم بمنتهى الوضوح أنّ " كلونات النسل " هذه قد نشأت بواسطة الفقد الكروموسومى أثناء الانقسامات الميتوزية وليس بواسطة أى نوع من الميوزى •

والنتيجة النهائية لهذا التتابع من الأحداث هو إنتاج كم هائل من التباديل المختلفة للمادة الوراثية الادمية فى مستعمرات (كلونات) النسل • وبدراسة كلونات النسل هذه ، أمكن لعلماء الوراثة إجراء دراسات مستفيضة عن وراثة الانسان •

٢ ــ ٣ : رسم خرائط الجينات الآدمية :

إن أول نوع من المعلومات التى أمكن الحصول عليها باستعمال الدورة بديلة الجنس هو تحديد بعض الجينات فى كروموسومات معينه • وأول جين آدمى وُقِّع خريطيا بهذه الطريقة كان الجين الذى يسيطر على تركيب إنزيم الثيميدين كينيز (أنظر ص ٢٠)• فخلايا آدمية حاملة لجين فعّال للثيميدين كينيز (يرمز له ب TK^+) قد اندمجت مع خلايا فأر حاملة لطفرة فى الجين TK ــ ومن ثم فهى فاقدة لهذا الانزيم TK^- ــ تعطى خلية هجين مندمجة ذات تركيب وراثى TK^+/TK^- تكون حاوية لانزيم الثيميدين كينيز الفعال ، مما يُثبت أن الأليل TK^+ سائد على الأليل TK^-.. فعندما يبدأ هذا الهجين الخلوى فى فقد الكروموسومات الآدمية ، فإن جميع المستعمرات (الكلونات) الناتجة سوف تحتوى على الجين TK^- الخاص بالفأر ، ولكن بعضا منها سوف يحتوى فقط على الكروموسوم الآدمى الحامل للجين TK^+ الآدمى والبعض الآخر لا يحتويه • والكلونات التى لا تحتوى خلاياها على الكروموسوم الآدمى



الشكل ٢ ـ ٥ :

الحد الفاصل بين خليتين من الثدييات أثناء عملية الاندماج مع بعضهما .

(عن هاريس ـ جامعة اكسفورد) .

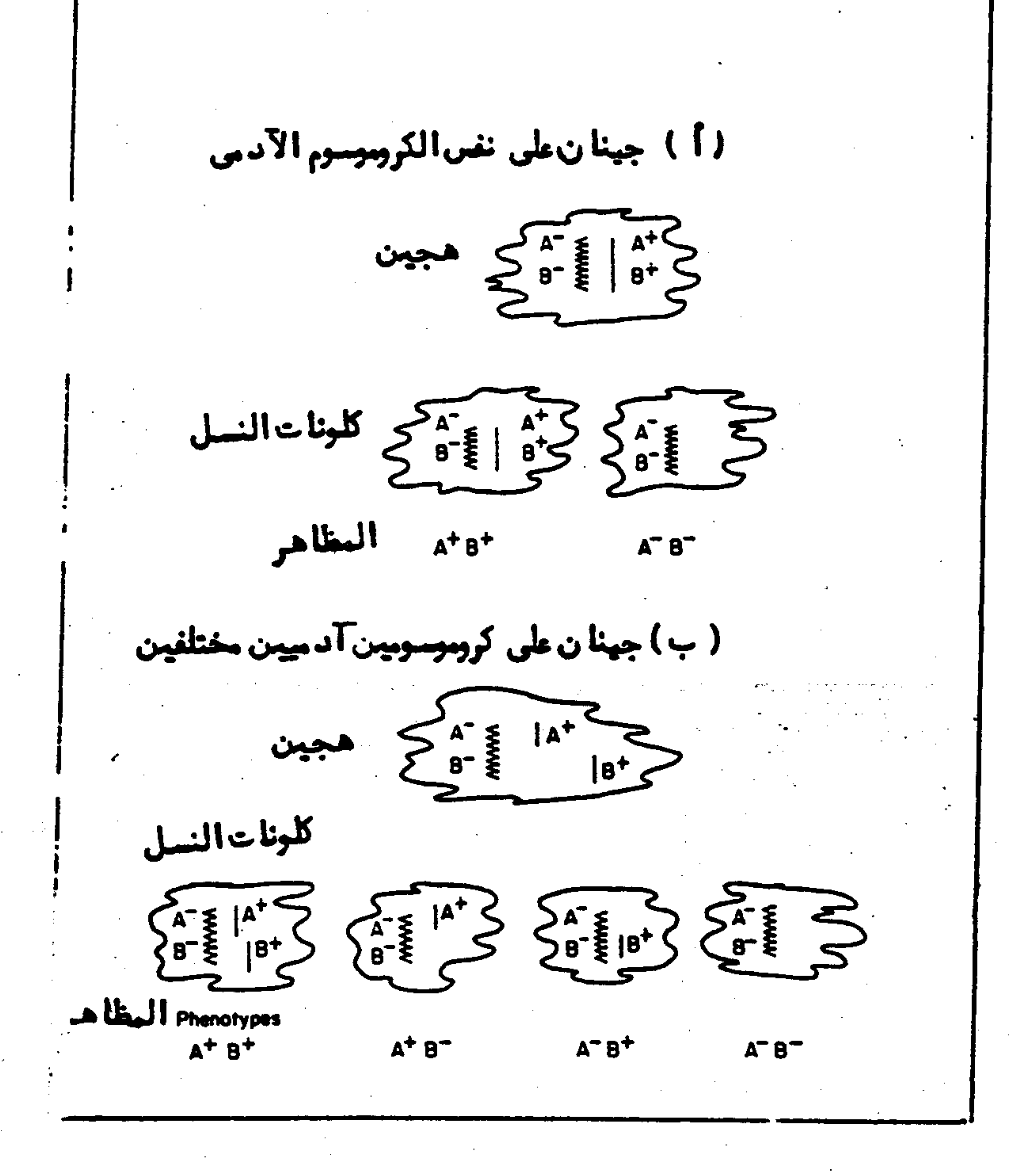
الحامل للجين TK^+ سوف يكون تركيبها الوراثى TK^-/TK^+ وتعطى المظهر TK^+ (حيث TK سائد على TK^-) . والكلونات التى لا تحتوى خلاياها على الكروموسوم الآدمى الحامل للجين TK^+ سوف يكون تركيبها الوراثى TK^- ، ومن الطبيعى أن يكون مظهرها TK^- (ومن حسن الحظ فإن المظهرين TK^+ و TK^- يمكن تمييزهما عمليا لأن TK^- يؤدى أيضا إلى المقاومة ضد العقار الطبى برومويوراسيل) .

بعد ذلك يمكن أن تختبر كلونات النسل وتصنف على أساس معيارين مختلفين : المعيار الأول يصنِّف الكلونات إلى TK^+ أو TK^- . والمعيار الثانى يصنفها على أساس فحص كروموسومات خلاياها سيتولوجيا ، وتجهز قائمة يبين فيها أى الكروموسومات الآدمية هو الموجود فى كلونات النسل . ويُمكِّن نوعا المعلومات المتوافرة من معرفة تواجد الجين TK^+ فى أيّ من الكروموسومات الآدمية . وفى حالتنا هذه اتضح أن هذا الجين موجود فى الكروموسوم الآدمى رقم ١٧ .

بعد هذا الاكتشاف المثير ، أمكن تحديد مواقع عديد من الجينات الآدمية وربطها بكروموسوماتها الموجودة فيها باستعمال تكنيكات مماثلة ، ومنها عديد من الجينات ذات الأهمية من الناحية الطبية . فعلى سبيل المثال ، الجينات المسئولة عن سلاسل الألفا وسلاسل البيتا هيموجلبين (α-and β- haemoglobin chains) الآدمى (والتى قد تكون معيبة فى بعض أنواع الأنيميا) قد أمكن توقيعها خريطيا على الكروموسومات رقم ١٦ و ١١ على التوالى . ويُحوِّر التكنيك قليلا فى حالة جينات الجلوبين ، حيث أن هذه الجينات لا يمكنها التعبير عن نفسها فى هذه المستنبتات . ومن ثم يجب أن تختبر مستعمرات النسل لوجود تتابع الد ن ا الخاص بجين الجلوبين الآدمى باستعمال تكنيكات الكيمياء الحيوية للأحماض النووية ، وليس بالبحث عن متعددة ببتيدات الجلوبين الآدمى) . وباستخدام هذه التكنيكات أمكن خريطيا توقيع جين يُضفى حساسية غير عادية لفيروس يسبب عيوبا تنفسية (يسمى فيروس كورونا) فى الكروموسوم الآدمى رقم ١٥ .

وهناك نوع آخر من المعلومات يمكن إشتقاقه من مستعمرات النسل للدورة بديلة الجنس ، وهو تحديد ما إذا كان جينان مرتبطان على نفس الكروموسوم أو موجودان فى كروموسومين مختلفين . دعنا نأخذ فى الاعتبار هجينا بين خط خلايا من الفأر يكون طافرا لجينين (ولنتعرف انهما $\bar{A}\ \bar{B}$) أدمج مع خط خلايا آدمى يكون حاملا للأليلين العاديين لنفس الجينين ($A^{+}\ B^{+}$) (الشكل ٢ ــ ٦) . فلو تصادف وجود الأليلين A و B على نفس الكروموسوم الآدمى ، فإن مستعمرات النسل إما أن تكون حاملة لهذا الكروموسوم ، ومن ثم سوف تكون هذه المستعمرات $A^{+}\ B^{+}$ أو لا تكون حاملة لهذا الكروموسوم ، ومن ثم ستكون هذه المستعمرات $\bar{A}\ \bar{B}$ (تذكر عدم وجود عملية إنقسام ميوزى وبناء على ذلك سوف لا تتكون كيازمات تؤدى إلى تكيين توافق $A^{-}B^{+}$ or $A^{+}B^{-}$. وعلى النقيض ، لو كان كل من A و B فى كروموسومين آدميين مختلفين ، فإن مستعمرات النسل قد تحتوى على واحد من اثنين من الكروموسومات الآدمية صاحبة الشأن ، فقد تكون إما $A^{+}\bar{B}$ أو $\bar{A}\ \bar{B}$. وباختصار فإن النسل الناتج سيكون فقط $A^{+}B^{+}$ او $\bar{A}\ \bar{B}$ عندما يكون الجينان فى نفس الكروموسوم الآدمى، وبناء على ذلك من الممكن تقرير ما إذا كان الجينان يقعان فى نفس الكروموسوم ، أى مرتبطان أم أنّ كلا منهما يقع فى كروموسوم مختلف .

إن إدراك وجود إرتباط بين جينين باستعمال التكنيك السابق ــ يختلف عن تحديد المسافة النسبية بينهما على نفس الكروموسوم . لذلك فقد أمكن تطوير تكنيكات لتحديد المسافة من خلال الدورة بديلة الجنس . وأحسن طريقة لذلك هو استخدام خلايا آدمية تحمل تنوعا من الكسرات الكروموسومية ، عقب التعريض الشديد للإشعاع لأحد الآباء فى " التهجين " بديل الجنس . فكلما كان الجينان أكثر بعدا على نفس الكروموسوم ، فإن الاحتمال يكون أكبر لأن تتكون كسرات كروموسومية بالاشعاع بينهما ، ومن ثم سينفصلان بتكرار أعلى أثناء الدورة بديلة الجنس . والأساليب الرياضية المستخدمة فى تقدير المسافة النسبية التى تفصل بينهما معقدة للغاية ، ولذلك سوف لا نتناولها فى هذا المقام .



الشكل ٢ ـ ٦ :

مستعمرات (كلونات) النسل من هُجن خليـة حاوية لجينين آدميين $\overset{+}{A}$ $\overset{+}{B}$ ناتجة من هجـين (فار / إنسان) عندما يكون الجينـان : (أ) على نفس الكروموسوم الادمى أو (ب) على كروموسومين مختلفين ٠

الكروموسومات الادمية مرسومه كخطوط مستقيمه. كروموسومات الفار مرسومة كخطوط متعرجة ٠ (للتبسيط ، جميع الكروموسومات غير الحاملة للجينات A أو B قد استبعدت) ٠

٢ ـ ٤ : التطبيقات العملية لخرائط الجينات الآدمية :

لقد أدى استعمال هذه التكنيكات المتطورة مع طرق الوراثة التقليدية ـ إلى تزايد سريع في المعلومات عن الخريطة الوراثية الآدمية . فقد أمكن حتى الآن تحديد مواقع عدة مئات من الجينات الآدمية على كروموسوماتها ومن بينها أكثر من ٢٠ جينا على الكروموسوم رقم ١ وأكثر من ١٠٠ جين على كروموسوم الجنس .

إن المعلومات المتوافرة عن الخريطة الوراثية الآدمية ذات أهمية في مجال البحوث الأساسية والبحوث الطبية . ففي المجال الأول ، على سبيل المثال ـ نجد أن المعلومات المتوافرة عن الجينات المتعلقة في وظائفها والتي قد تكون متجمعة مع بعضها على نفس الكروموسوم ، قد يؤدي إلى معرفة الطريقة التنظيمية التي تؤدي بها هذه الجينات وظائفها . أما في مجال الطب ، فإن توافر خريطة وراثية آدمية يكون ذا أهمية قصوى في مجال الاستشارات الوراثية . إن العيوب الوراثية قد لا تكون قابلة للتعرف عليها في خلايا السائل السلى للجنين (السائل الأمينوني) بواسطة عملية "البذل السلى" . وبالرغم من ذلك ، لو كان جين العيب شديد الارتباط بجين آخر يمكن التعرف عليه في خلايا السائل السلى ، فإن تواجد هذه الطفرة يمكن إدراكه ، وأن احتمال تواجد هذا العيب الوراثي يمكن أيضا أن يكون موجودا كما يمكن تقدير نسبته . وفي مثل هذه الحالة يمكن إسداء النصح للأم التي تفكر في الإجهاض .

البـــــاب الثالـــــث

إستخدام الاندماج الخلوى فى إنتاج الأجسام المضادة النقيـــــة

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

٣ ـ ١ مقدمـــة :

إن استعمال تكنولوجيا الاندماج الخلوى قد خطـى خطوات هامـة ودخل فـى مجالات جديـدة منذ عام ١٩٧٥م عندما أعلن كل من العالمين ج • كوهلـر و س • ملشتين نجاح عمليـة إندماج خلايا من طحـال الفأر مع خط خلايا سرطانـى راسخ • ولقد أفرزت الهجن الناتجـة (والمسماة (Hybridomas) طرازا محددا من الأجسام المضادة (جسم مضـاد أحاى المستعمرة (a monoclonal antibody) وكان لهذا الاكتشاف الهام دويا مثيرا فى عالم المناعـة •

لقد دُرِسَت الأجسام المضادة منذ سنوات عديدة مضت وأصبح من المعروف أنـه عندما تتواجد مواد غريبـة فى الدم ، فإن الجسم يستجيب لذلك بانتـاج مجموعة خاصة من بروتينـات الجلوبين المناعيـة تعرف باسم الأجسام المضادة .وتسمى هذه المواد الغريبة بالمولدات (الأنتيجينات) • فلو تواجـدت مادة غريبة نقيـة واحدة فى الدم ، فـإن ذلك يُعتَبر مولدة واحـدة ، بينما لو تواجـد بكتريم واحد أو ڤيروس واحد فقد يحتـوى كل منهمـا على عدة مولدات على سطحهما ، ومن ثمّ سـوف يُظهِر كل منهما خصائص لعدة مولدات كنـوع من الاستجابة •

وبالاضافـة لدورها الطبيعى فى الجسـد الآدمى ، فإن المولدات يمكن الحصـول عليها للاستعمال الطبى أو للاستعمال فى البحث البيولوجى، وذلك بالحقـن المتكرر لمولدة فى حيوان مثل الأرنب • وهذه المولدات لهـا عيبان خطيران : الأول أنها غير نقيـة ،

فبالرغم من كون الأرنب يستجيب للمولدة المحقونة ، إلا أنه ينتج العديد من الأجسام المضادة الأخر ضد المولدات الأخرى فى نفس الوقت . وتكون النتيجة تكون خليط من الأجسام المضادة والتى يكون من الصعب جدا تنقيتها . والعيب الخطير الثانى ، هو أن الأجسام المضادة تنتج بكميات محدودة . ويراود علماء المناعة الحُلم منذ زمن بعيد لايجاد طرق لانتاج أجسام مضادة نقية بكميات كبيرة . لقد فتح العالمان كوهلر وميلشتين الطريق واسعا لتحقيق هذا الهدف بانتاج الهجن الخلوية المسماه بالهيبريدومات .

٣ ـ ٢ : إنتاج الهيبريدومات :

إستمر العالم ميلشتين فى زرع خلايا الميلوما (myeloma) وهى نوع خاص من السرطان . ويمكن زراعة خلايا الميلوما هذه كمستنبتات خلوية راسخة وهذه تنتج بروتينات الجلوبين المناعية ، وهى مشابهة جدا ـ وربما مطابقة تماما ـ للجلوبينات المناعية والتى تعرف بالاجسام المضادة . ومن الأهمية بمكان معرفة أنّ خلايا " الميلوما " تفرز هذه البروتينات المناعية بمعدل عال جدا ، وأنه قد تم دراستها من الناحية البيوكيمائية لعدة سنوات كنظام نموذجى لانتاج الأجسام المضادة . وبالرغم من ذلك ، فإن طبيعة الجلوبينات المناعية المفرزة بواسطة خلايا " الميلوما " لم يمكن تحديدها بعد .

ولقد أدرك كل من ميلشتين ومعاونوه فكرة دمج خلايا " الميلوما " من الفأر مع خلايا مشتقة من طحال الفأر سبق حقنها بمولدة (أنتيجين) معروفة (الشكل ٣ ـ ١). وسميت الهجن الخلوية الناتجة " بالهيبريدومات " . ولقد أمكن جعل خلايا طحال فردية تنهمك فى تخليق اجسام مضادة فردية ، ومن ثم فقد وفرت هذه الطريقة معلومات عن كيفية تخليق جسم مضاد خاص لكل " هيبريدوما " .

وتوفر خلايا " الميلوما " معلومات عن تخليق بروتينات جلوبين مناعية غير محددة ،

ومن ثم ففى البداية أنتجت " الهيبريدومات " خليطا من الأجسام الضادة المحددة والجلوبينات المناعية غير المحددة . وحديثا أمكن عزل خطوط خلايا طافرة من " الميلوما " فقدت قدرتها على إنتاج جلوبيناتها المناعية الخاصة بها ، ولكنها كانت محتفظة بقدرتها على الاندماج مع خلايا الطحال ، وفى هذه الحالة كانت تفرز أجساما ضادة فردية محددة بواسطة خلايا الطحال فقط . ومثل هذه الأجسام الضادة الفردية يطلق عليها اسم " أجسام ضادة وحيدة المستعمرة Monoclonal antibodies وللاختصار يرمز لها بالرمز (Mc Abs)

ويحدث إندماج خلايا الطحال مع خلايا " الميلوما " السرطانية بتكرار منخفض . وفى أحسن التقديرات حوالى واحد من كل ١٠٠٠ خلية ميلوما يمكنها أن تعطى هجينا قابلا للحياة . ونستعمل مادة البولى إيثلين جلايكول (أنظر ص ١٩) لزيادة تكرار الاندماج . ولقد بذلت مجهودات كبيرة لتوفير الظروف المثالية لتنظيم عملية الاندماج الخلوى هذه ، وذلك باستعمال الآتى :

١ – ضبط النسبة بين خلايا الطحال وخلايا " الميلوما " .
٢ – معرفة درجة تركيز أيون الهيدروجين (pH) المناسبة .
٣ – توفير نوعية المصل المناسب فى البيئة ، وغيرها من العوامل المحددة .

وبالرغم من ذلك ، فمن الضرورى إجراء إنتخاب إيجابى للهيبريدوما من الزيادة الكبيرة فى خلايا الطحال وخلايا الميلوما غير المندمجة . ويمكن عمل ذلك باستعمال خلايا " ميلوما " طافرة ، تكون سالبة للانزيم ($HGPRT^-$) وتنميتها فى " بيئة هات HAT (كما سبق شرحه فى ص ٢٠) . ولا حاجة لاجراء إنتخاب مكثف ضد خلايا الطحال لأنها مستنبتات أولية؛ حيث من الطبيعى أنها تموت بعد فترة وجيزة .

وتنهمك الخلايا الفردية المأخوذة من طحال الفأر فى إفراز أجسام ضادة مختلفة إستجابة لمولدات مختلفة . والفأر الذى تؤخذ منه خلايا الطحال سوف لا يمكنه أن يتجنب

التعرف الكثير من السلالات البشرية، ومن ثم فخلاياه سوف تنشط لانتاج عديد من الأجسام المضادة في بداية التجربة. وبالرغم من أن سلالة مختارة قد حقنت في الحيوان قبل بداية التجربة لتزيد من نسبة خلايا الطحال المدفوعة لانتاج الجسم المضاد المرغوب، إلا أن عديدا من الخلايا الأخرى سوف تكون أيضا موجودة في مستحضر خلايا الطحال. ويترتب على ذلك أن الهيبريدومات الناتجة تكون خليطا من الأنواع المختلفة، وتتوقف ذلك على خلايا الطحال الأبوية الداخلة في الاندماج. وبناء على ذلك يجب أن تختبر الهيبريدومات فرديا لعزل الهيبريدوما التي تنتج الجسم المضاد المطلوب. وعندما يتم التعرف على الهيبريدوما المطلوبة، يمكن استزراعها إلى ما لا نهاية كمزرعة خلوية راسخة.

ولسوء الحظ فإن إنتاج الأجسام المضادة ليس دائما خاصية ثابتة للهيبريدوما. فعمليا قد يفقد هذه الخاصية تلقائيا أثناء الاستزراع الروتيني. ويحدث ذلك في بعض الحالات نتيجة لفقد الكروموسومات الحاملة للجينات المسئولة عن إنتاج الأجسام المضادة أثناء تكرار الاستزراع، وذلك بطريقة مشابهة لفقد الكروموسومات من هجين خلية آخر، كما سبق شرحه في الباب الثاني. ومن الممكن التغلب على هذه المشكلة باستخدام طفرات في جينات أخر تكون محمولة في نفس الكروموسوم، مثل جينات تخليق بروتينات الجلوبين المناعية. وبعد ذلك يمكن تنمية الهيبريدوما في بيئات تناسب الخلايا الحاملة للجين الطافر. وتعطي هذه الطريقة قدرة انتخابية إيجابية لتعيين القائم للعامل الطبي، ومن ثم للكروموسوم الحامل له وللجين المسئول عن إنتاج الجسم المضاد.

وعندما تحقن "الهيبريدوما" المناسبة بعد ذلك – إما في آنية استزراع أو يمكن حقنها في سائل الجسم للفأر (أو في جرذ، لو كانت خلايا الميلوما مشتقة أصلا من حيوان من نفس النوع). وفي داخل الحيوان تنمو الهيبريدوما كورم بريتوني استسقائي ((ورم ينمو حرا في سوائل الجسم، كمزرعة معلقة أكثر منه كورم جامد)).

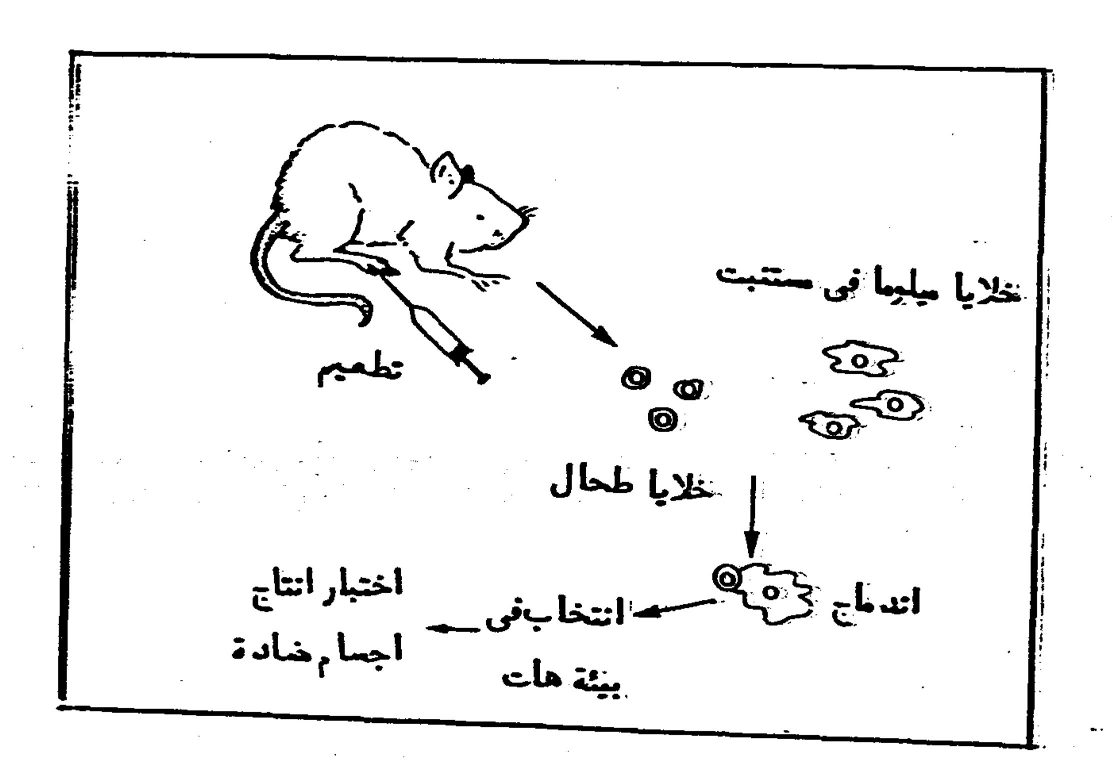
وميزة تنمية الهيبريدوما داخل جسم الحيوان تتلخص فى أن محصول الجسم المضاد يكون أعلى · وفى آنية الاستزراع يكون محصول الجسم المضاد حوالى ١ ٠ر٠ ملليجرام لكل ١ر٠ ملليلتر ، بينما يحمل دم أى حيوان عددا كبيرا من خلايا السائل البريتونى تتراوح ما بين ٥ ـ ٢٠ ملليجرام لكل ١ر٠ ملليلتر · وعيب هذه الطريقة أن الجسم المضاد المُنْتَج بواسطة هذا التكنيك ، يكون ملوثا ببروتينات أُخَر موجودة طبيعيا فى الدم ، ومن الصعب جدا تنقية الجسم المضاد المرغوب إلى درجة نقاوه أكثر من ٩٥ ٪ ·

٣ ـ ٣ بعض استعمالات الأجسام المضادة وحيدة المستعمرة :

٣ ـ ٣ ـ ١ : الأجسام المضادة وحيدة المستعمرة المضادة للأنتيجينات المرتبطة بأورام سرطانية :

تحمل بعض الخلايا السرطانية على أسطحها مولدات (أنتيجينات) غير متواجدة على أسطح الخلايا العادية فى نفس النسيج التى اشتقت منه هذه الخلايا · فلو أُنْتِجَت أجسام مضادة وحيدة المستعمرة يمكنها التفاعل بوجه خاص مع هذه الأنتيجينات ، فإنها سوف ترتبط خصيصا مع أسطح الخلايا السرطانية · ويمكن الاستفادة من ذلك فى عدة إستعمالات ·

١) يمكن إستعمال الأجسام المضادة المختصة بالورم السرطانى كوسيلة لدراسة إنتشار الخلايا السرطانية داخل الجسم ، سواء فى الدراسات التجريبية فى الحيوانات أو أثناء المعالجة الاكلينيكية للسرطانات الآدمية · وعلى سبيل المثال . يستعمل التكنيك لادراك إنتشار الخلايا السرطانية لأورام المخ فى مواقع أُخَر ثانوية فى الجسم.يمكن استكشاف الجسم المضاد وحيد المستعمرة الذى يرتبط مع المولدة على خلايا أورام المخ السرطانية بإضافة صبغة يمكنها الارتباط بالأجسام المضادة ، ويمكن رؤيتها كطبقة داكنة حول الخلايا السرطانية ·



الشكل ٣ ــ ١ :

تكنيك إنتاج الهيبريدومات . للتفاصيل أنظر الموضوع .

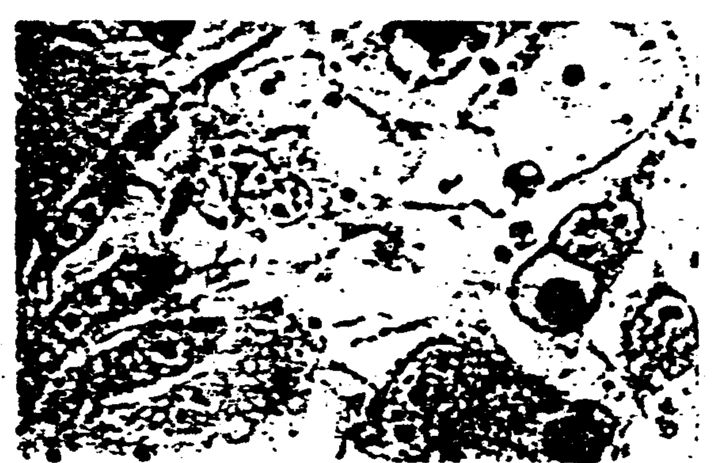
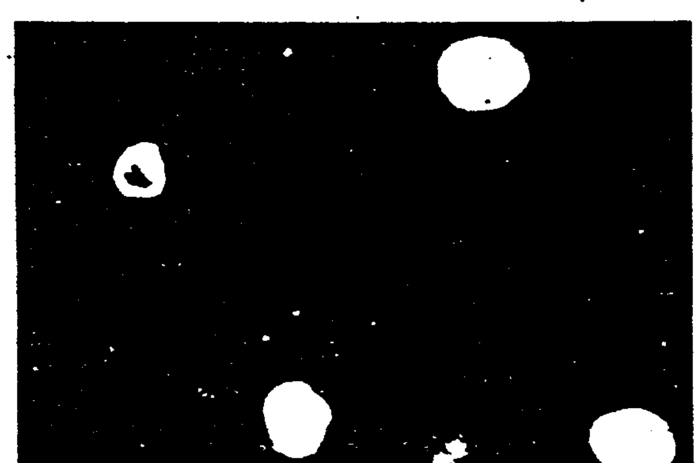
٢) قد تدخل معالجة السرطانات باستعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة حيز التنفيذ فى القريب العاجل • ويمكن أن يتم ذلك كيميائيا بواسطة ربط عقار طبى بالجسم الضاد وحيد المستعمرة مستغلين التخصص التفاعلى للجسم الضاد وحيد المستعمرة مع سطح الخلية السرطانية كوسيلة فعالة لتوجيه الدواء إلى هدفه • وكبديل لذلك ، ربما يكون للجسم الضاد وحيد المستعمرة تأثيرات مباشرة على السطح الخلوى للخلية السرطانية ، تودى إلى تحطيمها. كما أن البحث فى مجال السرطانات الحيوانية (على سبيل المثال ، لوكيميا " سرطان الدم " ـ الفئران) قد أعطى نتائج مبشرة باستعمال هذه الطريقة. لكن الدليل الواضح على النجاح الاكلينيكى لمعالجة الأورام الآدمية لم يتوفر حتى الآن • ومن الواضح أن هناك اهتماما متزايدا التركيز على هذا المجال من البحث •

٣ ـ ٣ ـ ٢ : استعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة ضد ڤيروس " رابى " :

لقد أمكن عزل " هيبريدومات " يمكنها إنتاج أجسام ضادة وحيدة المستعمرة لمقاومة عدد كبير من الڤيروسات والبكتريات الممرضة • وأحد الأمثلة ذات الأهمية الخاصة ـ هو اكتشاف أجسام ضادة وحيدة المستعمرة ضد ڤيروس " رابى " • ولقد أمكن تبيان أنّ هذه الأجسام الضادة تحمى الفئران ضد العدوى الڤيروسية،كما أن لها إمكانيات كبيرة للاستعمال فى الآدميين.وبالرغم من ذلك فان الوضع يبدو ـ لأول وهلة ـ أكثر تعقيدا مما نتصور،وذلك لأن السلالات المختلفة من ڤيروس " رابى " لها مولدات (أنتيجينات) مختلفة ، ومن ثم يمكن التعرف عليها بأجسام ضادة مختلفة • ويترتب على ذلك أن الجسم الضاد وحيد المستعمرة يجب أن يكون محدّدا لنوعية سلالة ڤيروس " رابى " •

٣ ـ ٣ ـ ٣ : إستعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة لتشخيص الأمراض الوبائية فى الانسان :

إن التشخيص السريع لطبيعة العدوى فى الأمراض الادمية ذو أهمية كبرى فى رسم

الشكل ٣ ــ ٢ :

إدراك وجود الكلاميديا باستعمال الاجسام الضادة وحيدة المستعمرة • وقد أمكن معرفة تواجد الكلاميديا فى داخل الخلايا (ناحية الشمال) باستعمال صبغة اليود (المناطق الداكنة) وفى ناحية اليمين باستعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة مرتبطة بصبغة فلورسنتية (المناطق البيضاء) •

استراتيجية العلاج . وفي بعض الأمراض ، يبدو أنّ استعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة ـ هو الوسيلة الفعالة البديلة للطرق التشخيصية المستعملة للتعرف ميكروسكوبيا أو ميكروبيولوجيا على الكائنات الدقيقة المسببة للمرض .

فعلى سبيل المثال ، يمكن استعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة للتشخيص السريع للعوامل المسببة للأمراض الجنسية الآدمية القابلة للانتقال ، ومنها بكتريا النيسيريا المسببة لمرض السيلان (Neisseria gonorrhoeae)

والطفيل البينخلوى الكلاميديا المسبب للمرض الزهرى Chlamydia trachomatis وبعض الفيروسات وحيدة الخيط المسببة للقوباء . ويُظهر كل من النيسيريا Neisseria والكلاميديا Chlamydia أعراضا إكلينيكية متشابهة جدا،ومن الصعب جدا التمييز بينهما . وبالرغم من ذلك ، فلقد وُجد أنّ استعمال الأجسام الضادة وحيدة المستعمرة يعطى وسيلة سريعة وواضحة لتشخيص هذه الكائنات (الشكل ٣ ـ ٢) .

البـــــاب الرابـــــــــــع

إلتقاط الد ن أ الغريب داخل خلايا الثدييات

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

٤ ـ ١ : مقدمـــــة :

لقد عرف علماء الوراثة ــ منذ سنين عدة ــ أن الد ن أ المشتق من سلالة بكتيرية ما يمكن إلتقاطه بواسطة سلالة بكتيرية أخرى ، حيث يندمج فى مادتها الوراثية بطريقة ثابتة ويصبح جزءًا منها، ويطلق على هذه الظاهرة لفظ " التحول الوراثى " (أنظر الجزء ١ ــ ٢ ، ص ٣) . فعلى سبيل المثال لو استخلص مقطع من د ن أ خلية بكتيرية حامل لجين مقاومة جسم مضاد معين ، ثم أضيف هذا المقطع لمزرعة خلوية لا تحمل مادتها الوراثية جين المقاومة هذا ، فإن بعض الخلايا الضيفة (المستقبلة) تصبح مقاومة لهذا الجسم المضاد ، وذلك بسبب اندماج شظية من د ن أ السلالة الواهبة فى كروموسوم الخلية الضيفة .

ولقد استعمل هذا التكنيك على نطاق واسع لدراسة التنظيم الجينى على الكروموسوم البكتيرى . والاستعمال الرئيسى له ، هو إيضاح ما إذا كانت الجينات شديدة الارتباط مع بعضها أم لا فى كروموسوم الخلية البكتيرية الواهبة .

وتتم الطريقة كالآتى : يتكون الد ن أ المستعمل فى التحول الوراثى من مقاطع صغيرة ، وعادة شظية د ن أ واحدة فقط ما تدخل فى خلية مستقبلة واحدة، وبذلك تستقبل هذه الخلية الضيفة الجينات المحمولة فى شظية هذا الد ن أ . فاذا فرضنا أنّ جينين يقعان على بعد كبير على كروموسوم الخلية البكتيرية الواهبة ، فإنهما سيكونان على شظيتين مختلفتين من الد ن أ ، وبناء على ذلك ، فمن غير المحتمل بدرجة كبيرة أن خلية بكتيرية مستقبلة واحدة قد تستضيف كلا الجينين . ويترتب على ذلك أنّ خلايا مستقبلة فردية (وأنسالها) سوف تكون متحولة لجين واحد أو لآخر . وعلى النقيض ،

لو كان هناك جينان شديدا الارتباط مع بعضهما على كروموسوم الخلية الواهبة ، فغالبا ما سيكونان على نفس شظية الد ن أ المحوّل ، وغالبا ما سيذهبان معاً إلى نفس الخلية المستقبلة ـ ويعرف ذلك "بالتحول المشترك "Co-transformation" وكلما كان الجينان أكثر قربا من بعضهما على الكروموسوم الواهب ، كلما كان احتمال تواجدهما معا أكثر على نفس المقطع من الد ن أ ، ويترتب على ذلك زيادة احتمال حدوث "التحول المشترك" . وقد أستعملت ظاهرة التحول المشترك لتعيين المسافات النسبية بين الجينات شديدة الارتباط فى البكتريات .

والسؤال الذى يطرح نفسه الآن هو : هل يمكن تطوير تكنيكات تجريبية مماثلة فى مزارع خلايا الثدييات ؟ لو كان الأمر كذلك ، فإن ذلك سوف يمكّن من إجراء التحليل الوراثى لمقاطع صغيرة من الكروموسومات الآدمية (وكذلك لكروموسومات غيرها من الثدييات) وذلك بقياس تكرارات التحوّل المشترك . وهناك آفاق أُخَر فى المستقبل البعيد ، وهى أنه لو أمكن إجراء التحوّل الوراثى فى الأجنة أو الجاميطات ، فان ذلك سوف يسمح بادخال د ن أ جديد فى المادة الوراثية للحيوانات المستأنسة مما يُمكِّن من تحوير صفاتها الوراثية بطرق لا يمكن تحقيقها باستعمال طرق التربية والانتخاب التقليدية . وهناك مجال آخر أكثر إثارة للجدل ، ألا وهو إمكانية علاج الامراض الوراثية الآدمية ، لو نجح إجراء التحول الوراثى فى خلايا أفراد حاملين لعيوب وراثية . وفى هذه الحالة يمكن علاج المرض الوراثى "بالمعالجة الجينية" بدلا من علاج أعراضه على المرضى ، والتى تتسبب نتيجة غياب نسخة سليمة من الجين المسئول .

وسوف نتناول فى هذا الباب الطرق المحتملة لأدخال الد ن أ فى خلايا الثدييات المنماة فى مستنبتات . وسوف نناقش إمكانية إدخال الد ن أ فى أجنة الثدييات ، فى باب لاحق .

٤ ـ ٢ : إلتقاط الكروموسومات الكاملة داخل خلايا الثدييات :

يوجد الـ د ن أ فى "الكروموسوم" البكتيرى على هيئة خيط دائرى مزدوج . وعلى النقيض، فإن الـ د ن أ فى كروموسومات الكائنات مميزات النوى يكون معقدا بالهستونات وغيرها من البروتينات، كما أنه يصبح محورا فى كروموسومات قضيبية الشكل وثيقة التركيب، أثناء دورة الانقسام الميتوزى . ويمكن لمحاولات التحول فى خلايا الثدييات أن تشمل نقل المادة الكروموسومية من الكائن الواهب إلى الكائن المستقبل، أو قد تشمل نقل الـ د ن أ المُنَقّى من الواهب إلى المستقبل . ولقد تم إجراء كلا الطريقتين بنجاح .

ويخطط فى الشكل ٤ ـ ١ تجربة نموذجية لنقل المعلومات الوراثية من خلال المادة الكروموسومية، حيث تُجهّز الخلايا الواهبة للتجربة باستزراعها فى بيئة محتوية لمادة "الكولشيسين"، وهو عقار طبى يوقف تقدم الخلايا فى محيط الدورة الميتوزية، وبذلك يصبح الـ د ن أ الخاص بها وكذلك البروتين متكاثفين فى نفس النموذج الخاص بالكروموسومات الميتوزية، وليس فى الحالة الأكثر انتشارا التى توجد فى نوى طور ما بين الانقسامين،ثم بعد ذلك تُمزّق الخلايا وتعزل الكروموسومات بواسطة الطرد المركزى المتغير . وبعد ذلك تضاف الكروموسومات لمزرعة مستقبلة (مضيفة) ، حيث يُلتقط بعض منها (حوالى ٢ لكل خلية داخل سيتوبلازم الخلية المضيفة بواسطة عملية الالتقاط الخلوى (Phagocytosis) . وتتكسر هذه الكروموسومات الملتقطة إلى شظايا صغيرة فى السيتوبلازم وهذه الشظايا غالبا ما تتجرد تماما . بالرغم من ذلك فلقد اثبت الفحص بالميكروسكوب الالكترونى أن شظايا كروموسومية صغيرة ـ أحيانا ما تدخل فى النواة . وقد يؤدى ذلك الى تحول فى الخلية المستقبلة .

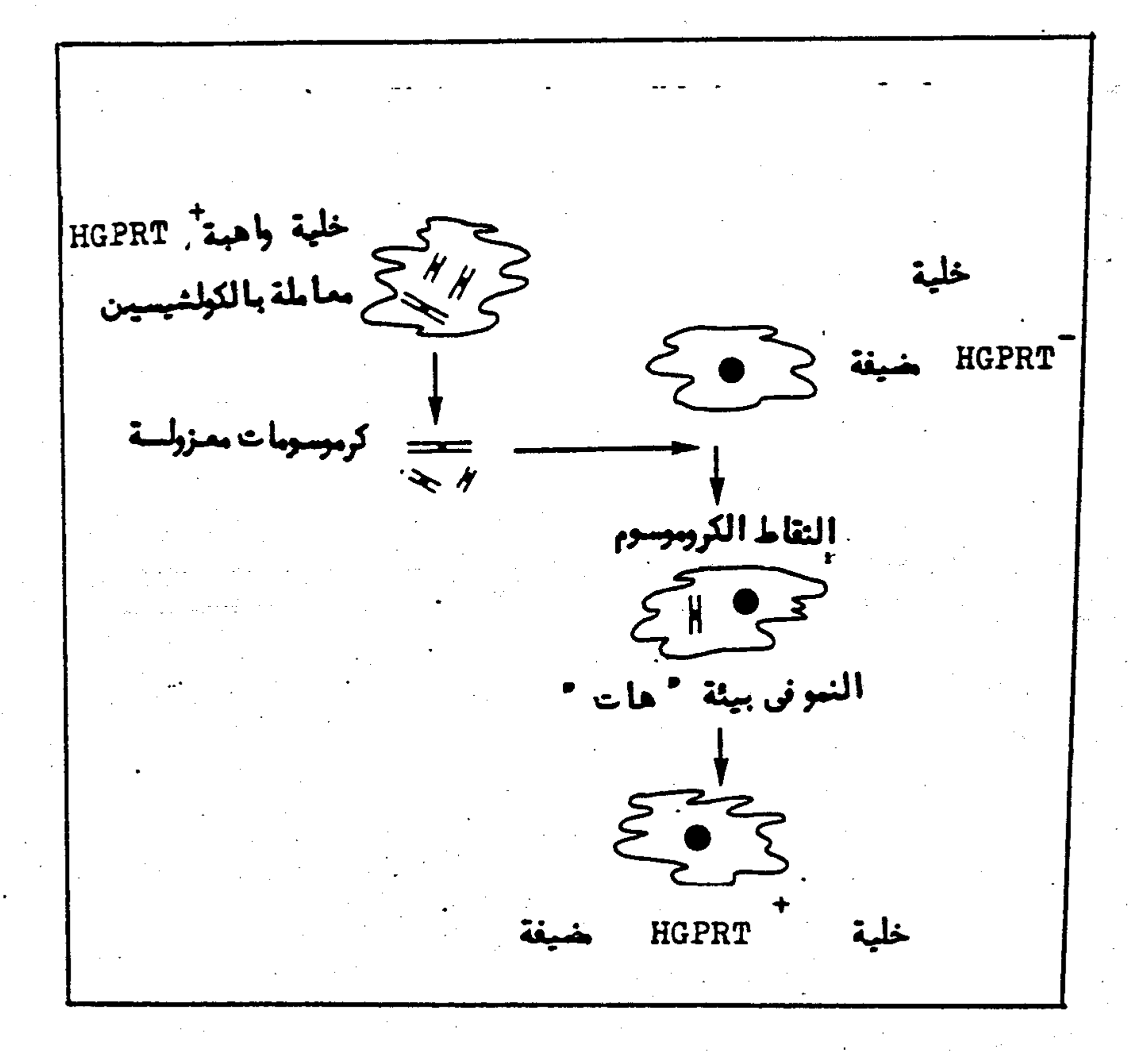
ويتطلب الامر وجود تكتيك إنتخابى لعزل العدد القليل من الخلايا المحوّلة من بين الغالبية العظمى من المستقبلات التى لم تصبح متحولة . والجين HGPRT

هو مثال للوسم كأسلوب لتسهيل الانتخاب (أنظر ص ١٥) . وهنا يجدر أن نعيد ذكر أن الخلايا $HGPRT^+$ يمكنها أن تنمو في بيئة "هات HAT"، لكن الخلايا $HGPRT^-$ لا يمكنها ذلك . وعندما تضاف كروموسومات من خلية واهبة من طراز $HGPRT^+$ إلى خلية مستقبلة من طراز $HGPRT^+$ ، فإن الخلايا الضيفة يمكن أن تنمو في بيئة "هات" (الشكل ٤ ــ ١) . والخلايا المستقبلة التي تحولت من $HGPRT^-$ الى $HGPRT^+$ سوف تنمو إلى كلونات (مستعمرات) حيث يمكن إعادة استزراعها لمزيد من الدراسة .

ويبدو أن إدماج الشظايا الكروموسومية الغريبة في النواة يتم على مرحلتين: ففي المرحلة الأولى ، تستنسخ شظية من الكروموسوم الغريب في النواة ، ولكنها لا تندمج في كروموسوماتها . ومثل هذه الشظايا ليس لها سنترومير ومن ثمّ لا يمكنها الارتباط بالمغزل الميتوزي ، ويترتب على ذلك عدم تحركها إلى أقطاب الخلية أثناء الدورة الميتوزية ، كما يُفقَد كثير من هذه الشظايا أثناء الانقسامات الميتوزية التالية على الالتقاط الكروموسومي . وهذا يتلازم مع عدم ثبات المظهر $HGPRT^+$ أثناء هذا الطور وربما يرتد الى المظهر $HGPRT^-$.

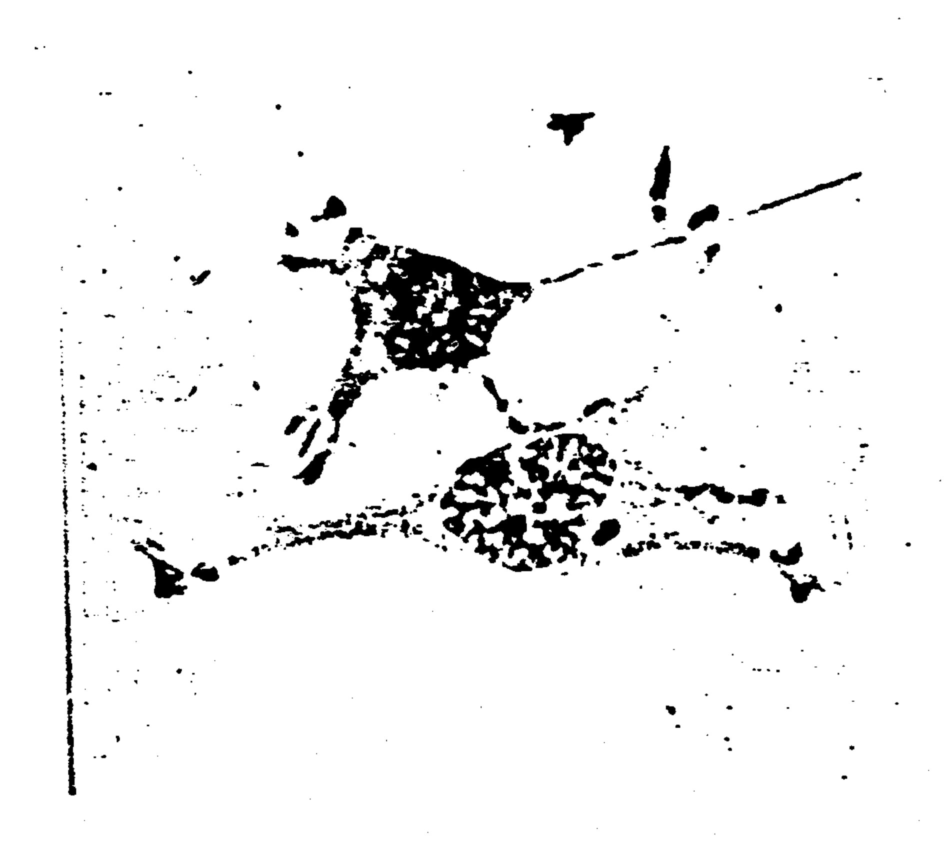
أما في المرحلة الثانية فإن المظهر $HGPRT^+$ يصبح ثابتا عقب إدماج الشظية الكروموسومية الغريبة في واحد من كروموسومات الخلية الضيفة . وهنا فإن الجين الداخل يتوزع أثناء الانقسام الميتوزي بطريقة منتظمة ، مثل الجينات الأُخَر في الخلية . ويحدث الإدماج في مواقع عشوائية على كروموسومات الخلية المستقبلة ، أكثر مما في الموقع الأصلي للجين HGPRT .

إن الطريقة المثالية لعملية التحوّل تشمل معاملة الكروموسومات الواهبة بفوسفات الكالسيوم والخلايا المضيفة بمادة ثنائي ميثيل السلفوكسيد dimethylsulphoxide . وتتباين كفاءة عملية التحوّل بدرجة كبيرة جدا بين نوعيات خطوط الخلايا المستقبلة ،



الشكل ٤ ـ ١ :

رسم تخطيطى يبين عملية نقل معلومات وراثية من خلية لأخرى باستعمال كروموسومات معزولة . فى هذه التجربة يجرى الانتخاب للجين $HGPRT^+$ للتفاصيل أنظر الموضوع .



الشكل ٤ ـ ٢ :

خلايا فأر مُنمّاة فى مزرعة بعد إضافة كروموسومات معزولة لبيئة النمو . إحدى الخلايا أدخلت كروموسوما فى سيتوبلازما ـ وهذا يظهر كمنطقة داكنة . الخلايا صبغت بصبغة فولجين .

ولكنها فى العادة منخفضة جدا حيث يندمج جين معين بنسبة ٢ فى كل ٠٠٠ر١٠٠ خلية ضيفة .

إن حجم الشظية الكروموسومية التى تصبح مولجة ضئيل للغاية (نسبة مئوية ضئيلة من كروموسوم ما) . وهذا يعنى أن هذا النوع من التحوّل من خلال وسيط كروموسومى يمكن أن يستعمل لدراسة ما إذا كان جينان مرتبطان معا بشدة على نفس الكروموسوم أم لا. والدليل هو نفسه كما سبق عرضه فى التحوّل البكتيرى فى الجزء ٤ ـ ١ . فلو كان هناك جينان شديدى الارتباط معا ، فإنهما سوف يميلان لأن يكونا معا على نفس شظية التحوّل الصغيرة للكروموسوم ، ومن ثم يتم تحولهما معاً . وبناء على ذلك فإن تكرار التحوّل المشترك يمكن أن يستعمل لتحديد البُعد النسبى بين جينين على كروموسوم آدمى . وهذا التكنيك ربما يعطى معلومات غاية فى الدقة عن المسافات النسبية بين أزواج من جينات آدمية أكثر مما يمكن الحصول عليه من خلال الدورة بديلة الجنس السابق ذكرها فى الباب الثانى .

٤ ـ ٣ : شظايا الدنا فى خلايا الثدييات :

إن تكنيك نقل الجينات من خلال وسيط كروموسومى ـ والذى سبق شرحه (فى الجزء ٤ ـ ٢) به بعض القصور . فالخلايا المتحوّله قليلة جدا ويلزم استعمال تكنيك إنتخابى مكثّف (على سبيل المثال انتخاب خلايا HGPRT^{+} بالتنمية فى بيئة هات) لعزل المتحوّلات . وعلى الرغم من ذلك ، توجد تكنيكات إنتخابية مناسبة فقط لعدد قليل من الجينات ، وكثير من الجينات لا يُظهر ميزة إنتخابية مناسبة على الخلايا فى المستنبت ، ومن ثمّ يكون من المستحيل إدراك وجودها بهذه الطريقة . فعلى سبيل المثال ، الجين المسئول عن البيتاجلوبين β-globin مقطع من جزئ الهيموجلبين) لا يضفى ميزة إنتخابية ، لكن دراسات التحول لهذا الجين سوف تكون ذات أهمية قصوى من الناحية الطبية والعلمية . ففى المجال الأول قد يكون

ممكنا علاج بعض حالات الأنيميا (الفاقة) الآدمية الوراثية ، والتى تشمل عيوبا فى هذا الجين ، وذلك عن طريق إيلاج نُسَخ عادية (سليمة) من هذا الجين فى خلايا المرضى (أنظر الباب السادس) . أما فى المجال العلمى البحت ، فإنه قد يكون عملا شيّقا لعلماء البيولوجيا الجزيئية أن يكونوا قادرين على تغيير قواعد الـ د ن أ داخل وحول جين الجلوبين ، ويترتب على ذلك إعادة إيلاج الجين المُحوّر إلى الكروموسوم المعيب . ولقد أمكن دراسة التأثيرات المترتبة على تغيير القواعد الفردية لجين ما من زاوية قدرة الجين على التعبير عن نفسه . وربما يوفّر هذا إمكانية الدخول مباشرة فى دراسة الأساس الجزيئى للسيطرة على نشاط الجين فى الكائنات مميزات النوى .

ويمكن إجراء تحوّل لجينات غير قابلة للانتخاب باستعمال د ن أ مُنَقّى (أفضل من كروموسومات كاملة) . وهذا التكنيك مشابهه لحدٍ ما لذلك المستعمل فى التحول البكتيرى . فيستخرج الـ د ن أ من خلايا واهبة بعد ترسيبه بأملاح الكالسيوم، ثم يضاف إلى خلايا مستقبلة . ويؤدى هذا التكنيك إلى تحول بتكرار منخفض (حوالى ١ فى كل ١٠٠٫٠٠٠ خلية مستقبلة) . وعلى الرغم من ذلك فإن الوضع ليس كما يبدو لأول وهلة . فكما فى البكتريات ، فإن عددا قليلا من الخلايا له القدرة على التحول، ويقال عن هذه الخلايا أنها " مؤهلة " للتحول . وبالرغم من أنّ معدل التحول فى عشائر الخلايا عامة يكون منخفضا ، إلا أن معدّل التحول فى تحت العشيرة الخلوية هذه يكون مرتفعا . والخلايا التى تتحول بواسطة جين واحد غالبا ما تتحول أيضا بجين ثان على مقطع منفصل من الـ د ن أ . ويمكن إستعمال هذه الظاهرة لعزل خلايا تكون قد تحولت بجينات لا تُضفى خصائص إنتخابية على الخلايا الضيفة .

ولقد أجرى العالم م . ويجلر واحدة من التجارب الأولى فى هذا المجال عام ١٩٧٦ (الشكل ٤ ـ ٣) ، مستعملا الجين TK^{+} (جين الثيميدين كَيْنز) . فالخلايا الموجبه لهذا الانزيم TK^{+} يمكن إنتخابها من بين الخلايا السالبة لهذا الانزيم

فى بيئــة هات HAT (أنظر ص ١٥) . فقد عُزِلَ ا لـد ن ا الحامل للجــــين من ڤـيروس باستعمال تقنيــات بيولوجيـة جزيئيـــة ، وعندما أُضيف هــذا ا لـد ن ا لخلايا سالبة TK^- لهذا الجين ، أمكن إدراك وجــود مُتحوّلات مُوجبة TK^+ لهذا الانزيم . وبعد ذلك أضــاف ويجلر خليطــا من د ن ا الجين TK^+ و د ن ا جــين جلوبــين الأرنب للخلايا الســالبة للانزيم TK^- ، ثم أجرى إنتخابــا للخلايا الموجبة TK^+ فى بيئة "هات" ، فوجـد أنّ معظم المستعمرات TK^+ التى نمت لم تدمج فقط الجين TK^+ لكنها أيضا قد أولجـت جين جلوبين الأرنب فى كروموســوماتها .

ولقد أمكن إثبــات وجود د ن أ جين جلوبين الأرنـــب فى الخلايا المتحولــــة باستعمال التقنيــات البيولوجية الجزيئية التى تبين وجود تتابعـــات قواعد د ن ا محددة . وبايجاز ، فإن د ن ا الخلايا المســتقبلة قد تغير من حلزون مزدوج إلى طراز مفــــرد الخيــط ، ثم بعد ذلك خلط مع عينه نشــطة إشعاعيا من د ن أ جين جلوبين طبيعــى والذى يعرف بالمسبر (probe) .وتحت ظروف معينة ، فإن الخيوط الفرديـــــة للد ن ا المِسْبَرى تصحح الجزيئــات مزدوجة الحلزون ذات الخيــوط الفردية لأى د ن ا خلوى والذى يحمــل تتابعات قاعديــة تكاملية . ومن ثم ، فإن التهجين للمِسْـــبر المشــع مع ا لد ن ا الخلــوى يبين وجود جين البيتاجلوبين β-globin فى المتحــولات .

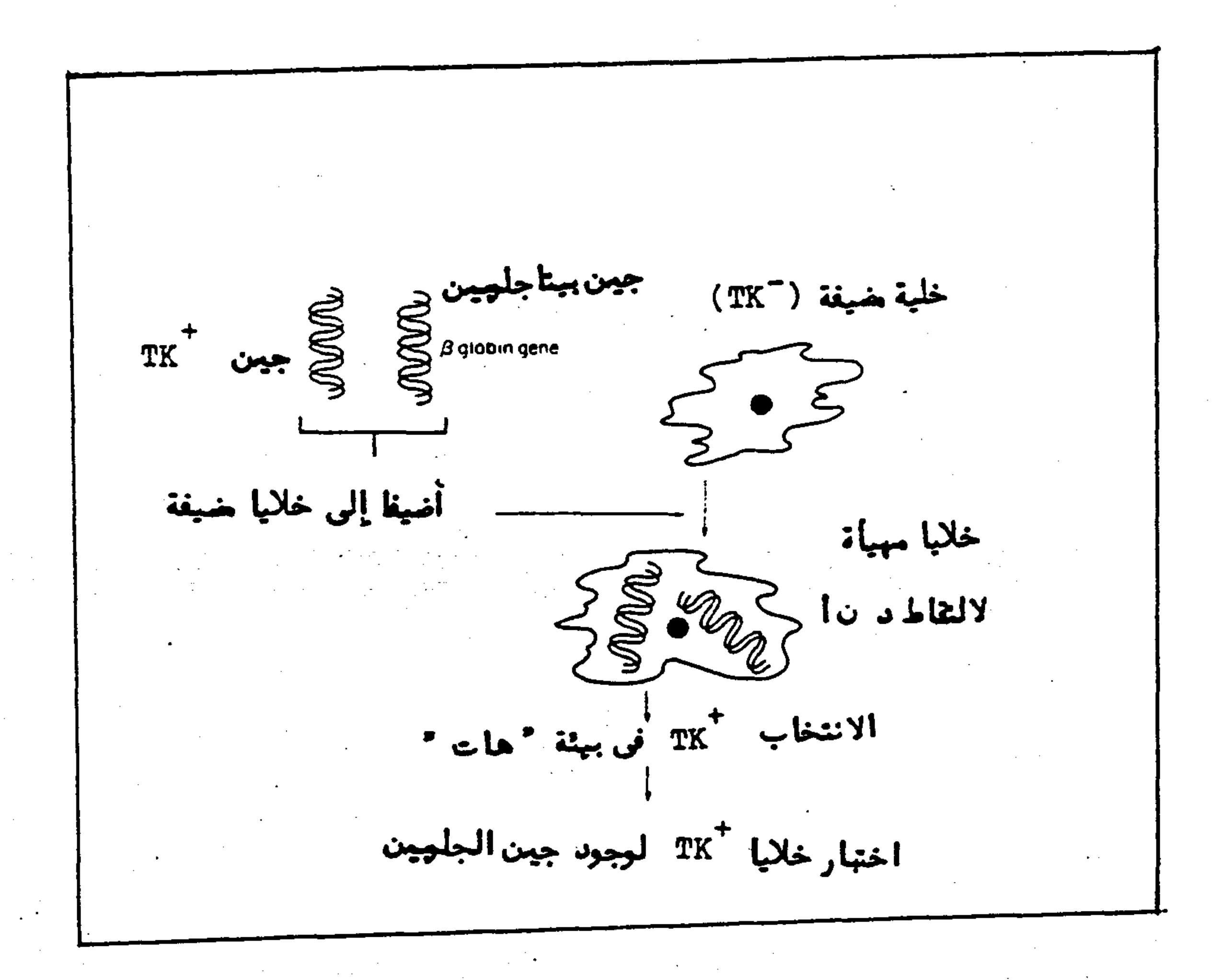
وجينات الجلوبين التى أولجت فى الخلايا المســتقبلة ثبت أنها مُولجة بثبات أثناء الانقســامات التى تلت الإيلاج . وربما قد يوجد نسخة أو أكثر من الجــين المُولَج فى خلية مســتقبلة واحدة وكذلك فى نسلها . وهناك كثير من أنــواع الد ن ا ـ غير جــــين البيتاجلوبين ـ قد أمكن إيلاجها فى خلايــا مضيفة . ويبدو أن هذا التكنيك له إمكانية تطبيقيــة عامة .والجديد فى هذا المجــال يشمل الحقن الدقيــق لأحجام ضئيلــة جدا من سائل محتــو على جينات فى نوى خلايا ناميــة فى مستنبتــات ، أو نامية فى أجنـــة لاحداث التحول . والاهمية الطبية الممكنة على المدى البعيد لتطوير هذه التقنيــات

سوف نتناولها فى الباب السادس ٠

٤ــ ٤ : إستعمال ظاهرة التحول فى بحوث السرطان :

إن القدرة على إدخال د ن أ فى خلايا ثدييات يعطى فرصة قيّمة لاختبار الضاعفات التى تترتب على إدخال د ن أ محدد التتابع فى الخلايا ٠ وهناك مثال شيّق وهام للغاية لمثل هذا النوع من العمل البحثى، ظهر منذ فترة وجيزة فى مجال بحوث السرطان ٠

يوجد سؤال جوهرى فى مجال بحوث السرطان وهو : ما هى طبيعة التغيرات الوراثية التى تحدث أثناء نمو السرطان ؟ فالمواد الكيميائية المعروف أنها تستحدث الطفرات ثبت دائما أنها تسبب السرطان ، ولقد قاد هذا إلى الاعتقاد الواسع بأن التغيرات فى الد ن أ تلعب دورا رئيسيا كمسببات للسرطان (المسرطنات). وبالرغم من ذلك توجد إختلافات فى الآراء عن طبيعة هذه التغيرات ٠ فتقترح إحدى مدارس الفكر العلمى أنّ هذه التغيرات تشمل إحلال إحدى القواعد فى جين عادى بقاعدة مخالفة ، ولكن التغيرات الأُخَر فى الد ن ا ممكنة أيضا ٠ ويوجد دليل غير مباشر يقترح أن جينا ما ربما يُحَرَّك لموضع مختلف على الكروموسوم (أو على كروموسوم مختلف) أثناء استحداث السرطان ٠ ومن المعروف أن تتابعات القواعد التى تقع على جانبى كل جين من الجينات جميعها يمكنها أن تؤثر على مستويات تعبيرها (أى المعدل الذى عنده تنسخ إلى ر ن ا حامل الرسالة mRNA ، ومن ثم سيطرته الشفرية على البروتين) ٠ فلو أن جينا ما قد حُرّك إلى موضع مختلف (ومن العجيب أن هذه الظاهرة معروف أنها تحدث الآن فى الخلايا الجينات القافزة Jumping genes فسوف يكون له تتابعات قاعدية مختلفة على جانبيه ، ومن ثم فقد تتغير درجة تعبيره ٠ فإذا كان الجين يسيطر على تنظيم إنقسام الخلية فإن مستويات التعبير المتغيرة يمكنها أن تغيّر السيطرة على إنقسام الخلية ٠



الشكل ٤ ــ ٣ :

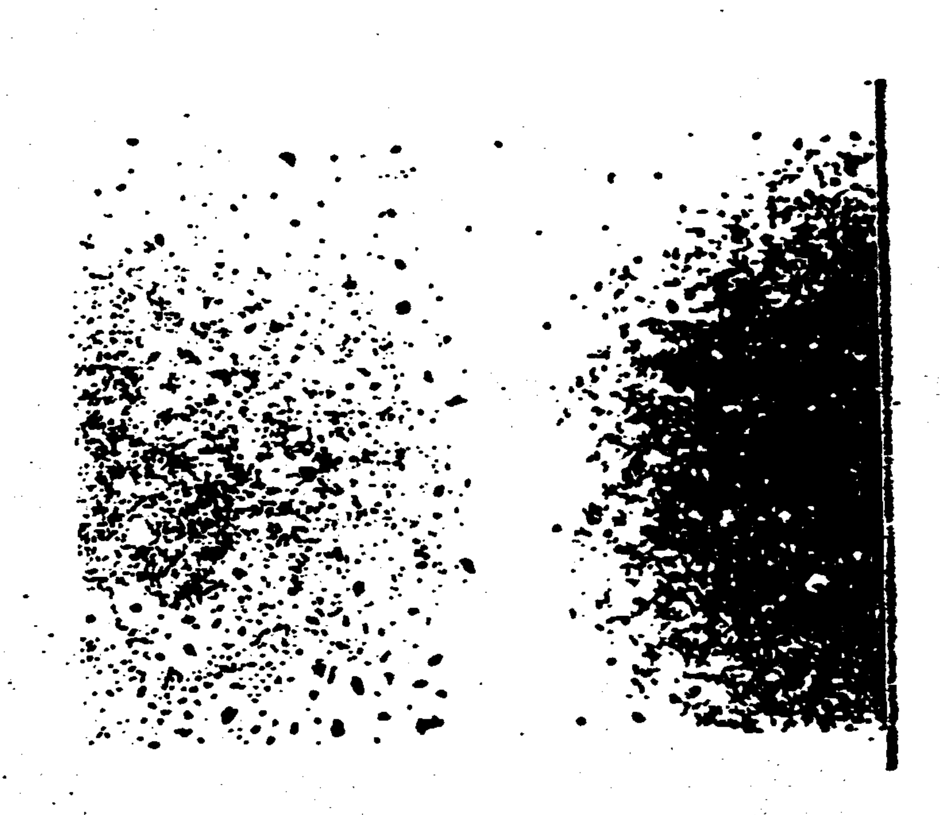
رسم تخطيطى للالتقاط المتزامن للد ن أ الحامل لجين واسم قابل للانتخاب (الجين TK^+ والد ن ا الحامل لجين واسم غير قابل للانتخاب (جين البيتا جلوبين) فى خلايا ثدييات " مؤهله " للتحول • أنظر التفاصيل بالداخل •

ويجرى حاليا البحث فى هذا الموضوع بواسطة دراسة الآثار المترتبة على إلتقاط (شغط) د ن ا حامل لجينات سرطان أو تتابعات قواعد شديدة القرابة فى خلايا مُنمّاة فى مستنبتات • إن الاستراتيجية الأساسية لهذه الدراسة هى استكشاف أنواع الد ن ا التى تحول الخلايا إلى نموات سرطانية • ومن حسن الحظ أن ذلك يمكن دراسته فى مستنبت لأن الخلايا السرطانية تنمو فى حشود مكدسة على عكس الخلايا العادية التى تنمو فى طبقة واحدة (الشكل ٤ ـ ٤)• فلو أدى شغط الد ن ا إلى أن تصبح الخلايا سرطانية ، فإن ذلك يمكن رؤيته بالملاحظة المباشرة للمستنبتات. وباستعمال هذا التكتيك كوسيلة للمسح ، فقد يكون من الممكن أن نتعرف على الد ن ا فى الأورام والذى ربما يكون مسئولا عن النمو السرطانى •

لقد عزل العالم س • ج •تابين جينا من سرطان المثانة الآدمى ، ويسبب هذا الجين النمو السرطانى عندما يُلتقط بواسطة خلايا مستقبلة مناة فى مستنبت • ويوجد تتابع د ن أ شديد الشبه فى الخلايا العادية للمثانة لكن هذا التتابع لا يغير طراز النمو عندما يُلتَقط بواسطة الخلايا المستقبلة • وهنا يطرح السؤال التالى نفسه : ما هو الفرق المؤكد بين جين السرطان الطافر وأليله العادى المقابل ؟ لقد أوضح تابين (Tabin) ومعاونوه ـ فى معهد ماساشوستس بالولايات المتحدة ـ أنّ هناك مئات من القواعد فى تتابع الد ن آ لجين السرطان متطابقة مع تتابعات الجين العادى المقابل ، لكن قاعدة واحدة فقط قد تغيرت • فقاعدة جوانين (ج) قد استُبْدِلت بقاعدة ثيمين (ث) مما ترتب عليه تغيرا فى قواعد الشفرة الوراثية الثلاثية من ج ج س إلى ج ث س • وترتب على ذلك أنّ حمضا امينيا واحدا فى البروتين المُسَيطر عليه شفريا بالجين قد تغير من جيلسين فى الخلايا العادية إلى فالين فى خلايا السرطان •

ومن المحتمل أن هذا الاستبدال للحمض الأمينى قد غيّر الشكل ثالوثى الأبعاد للبروتين ، لكن ليس من الواضح حتى الان لماذا أدى ذلك إلى النمو السرطانى •

وتشير هذه التجربــــة فى هذه الحالة إلى أن أبسـط نوع من الطفرات (مشابهة لتلك المعروف حدوثها فى بعض الأمراض الوراثيــة مثل أنيميا الخلايا المنجلية) قــد أدى الى نمو سرطانى . والرغم من ذلك ، فهنـاك بعض التحفظات العديدة التى يجب أن توخذ فى الاعتبار عند تفسير هذه النتائج . إن الباحثين بالتأكيـد - لا يقترحون أن كل أنواع السرطان تشمل نفس التغير القاعدى فى ا لد ن ا المسئول وثانيا ، إن دراسة النمو السـرطانى فى الأنبيب - من المحتمل أن يكون مكافئا لواحدة من خطوات عديدة فى أثناء نمو الورم الخبيث . (وعلى سبيل المثال فان اكتـساب خلايا السرطان القدرة على الهجرة إلى مواضع جديدة داخل الجسم لتكون نموات ثانوية من المحتمل أنها تمثل خطوة مختلفة) . والرغم من أننا واضعين فى ذهننا هـذه التحفظات ، إلا أن إجراء مثل هذا النوع من التجارب التى سردت هنا - يمثـل خطوة جوهرية متقدمة فى مجال بحوث السرطان .



الشكل ٤ ــ ٤ :

جزء من مستعمرة عادية لخلايا الهامستر (الفار الصينى) (يسار) وجزء من مستعمرة خلايا هامستر سرطانية (يمين) • تنمو الخلايا السرطانية فى حشد مكدس التنظيم وتظهر داكنة أكثر عندما ينظر اليها من أعلى • (عن مجلة نيتشر Nature).

الباب الخامس

استزراع الجينات فى خلايا الثدييات

٥ ـ ١ : استزراع الجينات فى البكتريات :

إن واحدا من أهم الاكتشافات المثيرة فى علم البيولوجيا ـ فى خلال السنوات القليلة الماضية ـ هو تطوير تكنيكات لادخال مادة وراثية جديدة فى الخلايا البكتيرية بواسطة إستزراع الجينات . ففى تجارب الاستزراع هذه ، تُحمل الجينات على مُوَجّهات تتناسخ ذاتيا على شكل دوائر صغيرة من الد ن أ تسمى البلازميدات . وقد تكون هذه الموجهات عبارة عن د ن أ " لكروموسوم " فاج (أى فيروس بكتيرى) . والجينات التى يُرغَب فى نقلها ربما تكون مشتقة من نوع آخر من الخلايا البكتيرية ، أو من خلايا كائنات مميزة النوى أو ربما تكون مخلّقة كيميائيا . وعندما تولج قطعة من د ن أ غريب فى مُوَجِّه ما ، فان التركيبة الجديدة للد ن أ تسمى "جزىء د ن أ مطعم " .

وفى بعض الحالات عندما تدخل الجينات الغريبة المُولَجَة فى "مُوَجِّه" وفى خلايا بكتيرية ، فان هذه الجينات سوف تُنْسَخ إلى م . ر ن أ ، كما أنّ البروتينات المُسَيْطر عليها شفريا بواسطة هذه الجينات سوف تتخلّق داخل الخلايا الضيفة . فعلى سبيل المثال ، عندما تستزرع جينات الانسولين الآدمية فى البكتريا ، فان هذا الانسولين ينتج بكميات وفيرة ويمكن إستعماله فى علاج مرضى السكر الآدميين بدلا من الانسولين البنكرياسى المشتق تقليديا من الأبقار أو الخنازير .

ولما كان الهدف من هذا الكتاب هو إعطاء فكرة عن الهندسة الوراثية فى الكائنات الراقية ، لذلك فسوف لا نقدم موضوع إستزراع الجينات في البكتريات بكل تفاصيله ، ويمكن للقارىء أن يرجع إلى المراجع العديدة فى هذا الموضوع . وبالرغم من ذلك سوف

نعطى ملخصا وافيا عنه كخلفية للمعلومات التى تلزم لمناقشة إستزواع الجينات فى خلايا الثدييات ، وكذلك إعطاء فكرة عن إمكانيات تطبيق الهندسة الوارثية فى النباتات كوسيلة لحل مشاكل الزراعة والغذاء لرفاهية الجنس البشرى .

إنّ إيلاج مقاطع من الد ن أ الغريب فى د ن أ بلازميدات أو د ن أ فيروسات - فى الأنبوب - يعتمد بدرجة كبيرة على مجموعة من الانزيمات البكتيرية تسمى "إنزيمات القطع الداخلنووية (Restriction endonucleases). والدور البيولوجى لهذه الانزيمات هو قطع الد ن ا عند تتابعات قواعد محددة (والتى تختلف باختلاف الانزيمات)، ولذلك تُجَرِّد الد ن أ (الفيروسى) الغريب الداخل إلى الخلية . وتحمى البكتريات الد ن أ الخاص بها بإضافة مجموعات ميثيل لقواعد معينة فى تتابعات القواعد المُحَدَّدة هذه ، وذلك باستعمال مجموعة أخرى من الانزيمات . ويجب الاشارة إلى أن الد ن أ الميثل لا يتجرد بواسطة إنزيمات القطع الداخلنووية .

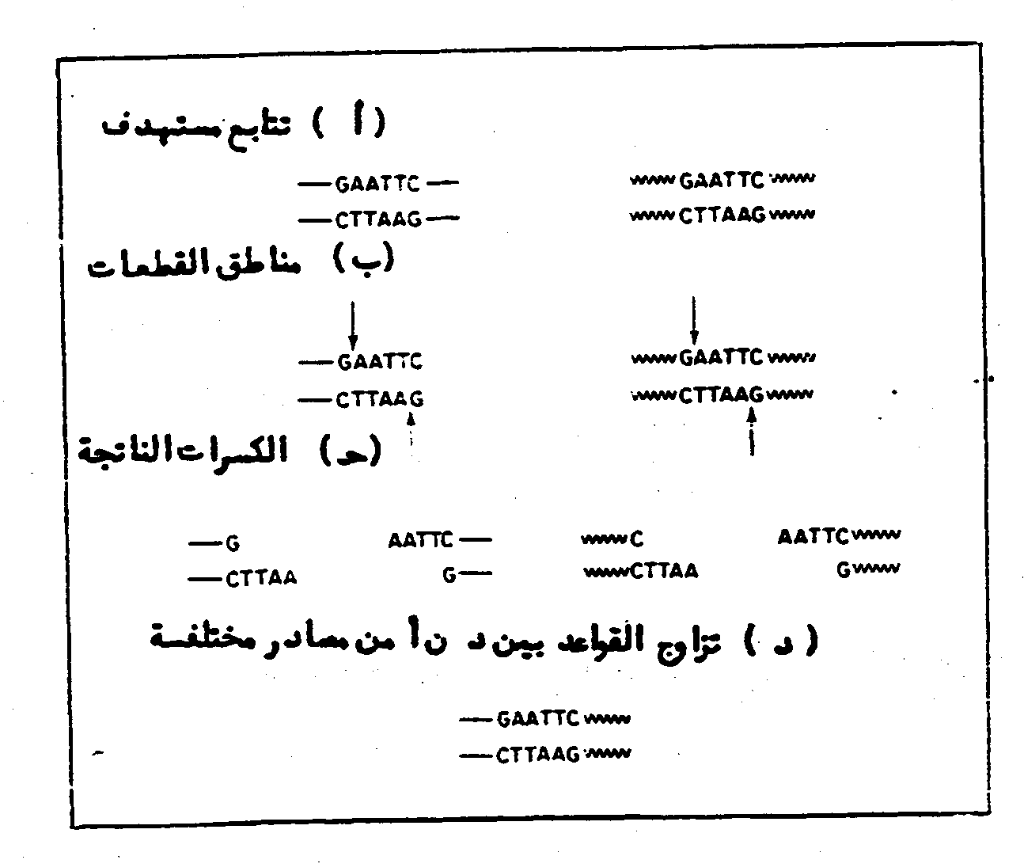
وقد تستعمل إنزيمات القطع الداخلنووية فى المعمل بعدة طرق لبناء جزيئات د ن أ مطعمة . وبعض هذه الانزيمات تعمل قطعات متعاكسة فى تتابعات محددة من الد ن أ (بغض النظر عن مصدره). وهذه القطعات المتعاكسة مفيدة فى إعادة وصل شظايا الد ن أ المختلفة. والقطعات المتخالفة المنتجة بواسطة أحد هذه الانزيمات وهو (Eco-RI) مبينة فى الشكل ٥ - ١ . وانزيمات القطع الداخلنووية تسمى باسم مصدرها البكتيرى ، فالانزيم Eco-RI مشتق من بكتريا القولون Escherichia coli . فإذا استعمل نفس الانزيم على جزيئات د ن أ من مصدرين مختلفين ، فإنه سوف يقطعهما عند نفس التتابع ، منتجا نفس أذيال الخيط المُفْرد فى كلا الجزيئين .

وتحت الظروف الملائمة ، فإن تزاوج القواعد (أ مع ث ، ج مع س) سوف يحدث بين المناطق فردية الخيط الحرة ، لأن لهما تتابعات قواعد متكاملة (الشكل ٥ - ١د). أما الفجوات فى هيكل السكر - الفوسفات لجزئ الد ن أ بين قطعتى الد ن ا فيمكنهما

الآن أن تترابط تساهميا باستعمال إنزيم آخر (هو إنزيم لحام الد ن أ DNA-ligase لتكوين جزئ د ن أ مطعم يحتوى على د ن أ من مصدرين مختلفين .

وفى عملية استزراع الجينات ، فإن أحد الجزيئات (ممثلا كدائرة فى الشكل ٥ ـ ٢) قد يكون د ن أ بلازميد " للكروموسوم " الفيروسى ، والجزئ الآخر (ممثلا كخط مستقيم) قد يكون شظية من الد ن أ الغريب وهو الذى سوف يولج . بإنزيم القطع يقطع الدائرة ويفتحها كما سبق شرحه فى الشكل ٥ ـ ١ تاركا ذيلين من الخيوط الفردية . وهذه القواعد تتزاوج مع الذيول فردية الخيط للد ن أ الغريب التى ستُولَج . فلو أستعمل بلازميد ما ، فإن بعضا من جزيئات د ن أ البلازميد سوف تُلتَقَط داخل الخلايا البكتيرية ، عقب المعاملة بكلوريد الكالسيوم وبالصدمة الحرارية عند ٤٢ °م ، ثم بعد ذلك تتناسخ مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى . والبلازميدات المستعملة لاستزراع الجينات غالبا ما تحمل جينات لمقاومة العقاقير الطبية ، ومن ثم فمن الممكن أن تُعزل هذه البكتريات على بيئة محتوية على العقار . وفى حالة " الكروموسوم " الفيروسى فيمكن أنْ يُحَشّر الد ن أ فى الأغلفة البروتينية الفيروسية ثم يحقن فى الخلايا البكتيرية ، بشرط ألاّ يكون جزئ الد ن أ المطعم كبيرا جدا على إمكانية حَشْره فى الغلاف البروتينى . وقد تستبعد بعض المناطق غير الضرورية من د ن أ الفاج للتأكد من أنّ الجزئ المطعم الحامل لد ن أ " زيادة " ذو حجم مناسب .

لقد أحدث هذا النوع من التكنيكات ثورة فى مجال الوراثة البكتيرية . فهل من الممكن إستعمال تكنيكات مماثلة فى خلايا الكائنات الراقية (مميزات النوى) ؟ هناك عدة أسباب وجيهة تجعلنا نتمنى تحقيق هذا الهدف . أولا : على المستوى الجزيئى فان تعبير الجين فى خلايا مميزات النوى يختلف إختلافات جوهرية عنه فى خلايا بدائيات النوى . ومن ثم فإن الدراسات الخاصة بالتحكم فى تعبير الجين فى حالة جينات الكائنات مميزات النوى يكون له نتائج أفضل كثيرا لو أن هذه

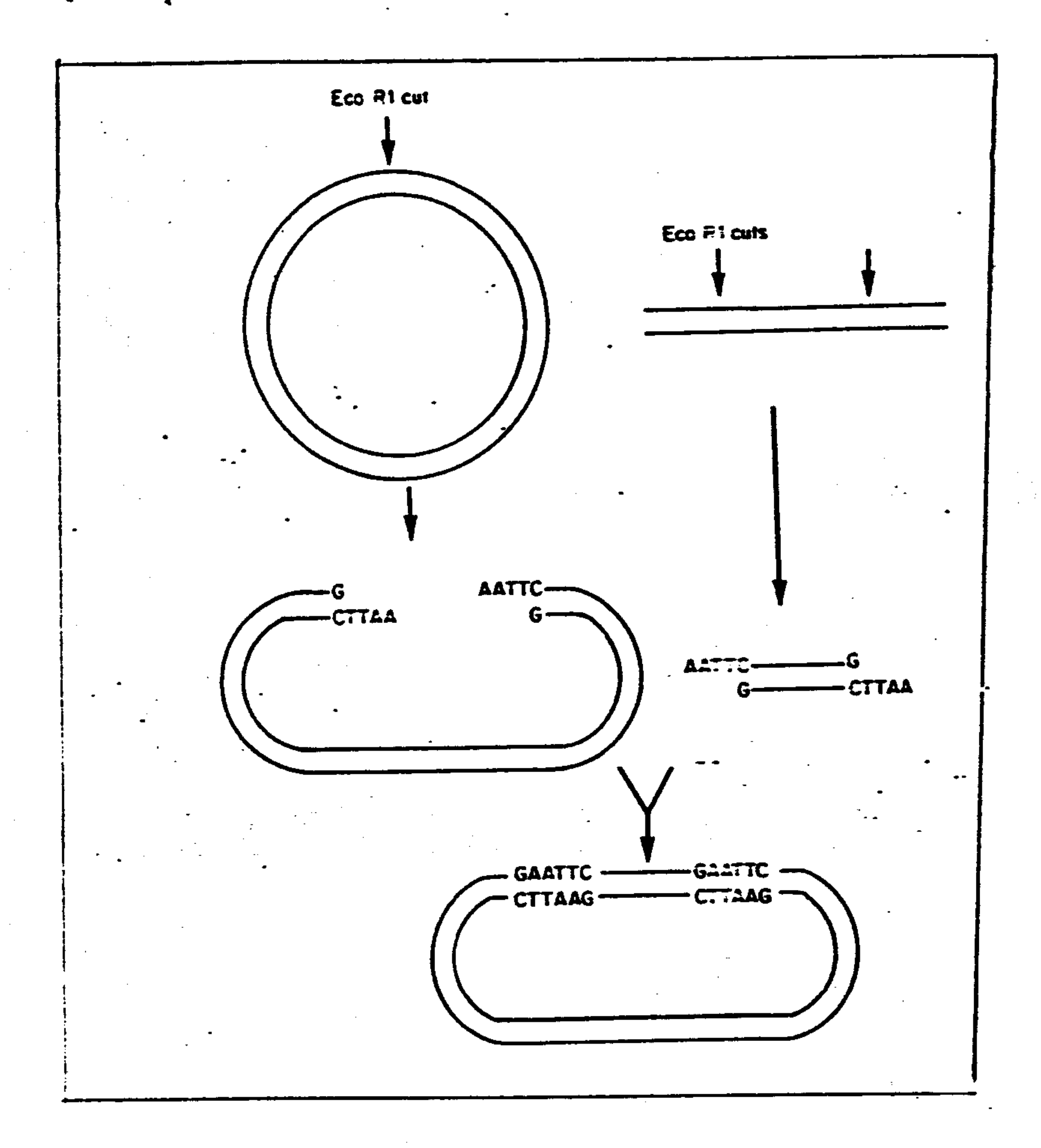


الشكل ٥ ـ ١ :

استعمال انزيم Eco RI لانتاج قطعات متعاكسة فى الد ن أ :

(أ) التتابع المستهدف للانزيم ، وهو تتابع محدد لست قواعد . مُثّلت القواعد خارج نطاق التتابع المستهدف بخطوط فى هذا الشكل وللتمييز بين جزيئات الد ن ا من مصدرين مختلفين ، مُثّل الد ن أ ناحية اليسار بخطوط مستقيمة وال د ن أ ناحية اليمين مُثّل بخطوط مموّجة .

(ب) مُثّلت مواقع القطعات بواسطة الانزيم بأسهم قائمة . (حـ) الكسرة الناتجة تنتج ذيولا فردية الخيط . (د) يمكن أن يحدث تزاوج القواعد بين د ن أ من مصدرين مختلفين لأن كلاهما له ذيلان مفردى الخيط بتتابعات قواعد تكاملية .



الشكل ٥ ــ ٢ :

إيلاج شظية من د ن أ غريب في مُوجّه بلازميدى • كل من جزيئى الد ن أ قُطِع بواسطة نفس الانزيم ، ومن ثمّ فلهاذيول فردية الخيط تكاملية • بُيّنت القواعد فقط عند مناطق القطع• مناطق الد ن أ الاخرى مُثّلت بخطوط للتبسيط •

الجينات قد استزرعت فى خلايا مميزة النوى عن الخلايا بدائية النوى .

وسبب آخر للرغبة فى استزراع الجينات فى خلايا مميزة النوى ، هو أن هذه الخلايا تحوّر بعض البروتينات عقب التخليق بطرق لا تتم فى البكتريات . وعلى وجه الخصوص فإن بروتينات الخلايا مميزات النوى يحدث لها تحول جليكوسيوى (تسكر) ؛ أى قد يكون بها قواعد سكرية مرتبطة ببعض أحماضها الأمينية . فعلى سبيل المثال ، الجين المسئول عن البيتا إنترفيرون B- interferon (مادة ذات أهمية كمضاد فيروسى) أمكن استزراعه فى البكتريات ، لكن الإنترفيرون المنتج فى هذه الخلايا لم يكتسب الطراز العادى للتسكر (الجلكتة glycosylation) وهذا يغير من خصائصه . أما استزراع جين البيتا إنترفيرون فى خلايا ثدييات فإنه يعطى جزئ بروتين كامل التسكر. هذه الاعتبارات ربما يكون لها أهمية كبرى على الانتاج التجارى لبعض البروتينات .

وسبب ثالث للرغبة فى استزراع الجين فى خلايا مميزة النوى ، ألا وهو تطوير تكنيكات لادخال أنواع جديدة من المادة الوراثية فى كائنات بأكملها . وهذه المحاولات سوف نتناولها فى البابين التاليين .

٥ ــ ٢ : إلتقاط البلازميدات البكتيرية داخل خلايا الثدييات :

أحيانا تلتحم الخلايا البكتيرية مع خلايا ثدييات عندما تخلطان معا . والمعدّل التلقائى لذلك منخفض جدا ، ويمكن زيادته بازالة جدر الخلايا البكتيرية (أى بعمل بروتوبلاستات بكتيرية) وبإضافة مادة بولى إيثلين الجليكول . وحديثا أمكن بيان أن جميع خلايا الثدييات الموجودة تدخل فى عملية الاندماج أو أن البروتوبلاستات البكتيرية قد تواجدت بكثرة فى بيئة الاندماج .

وتسمح هذه الطريقة مباشرة بإدخال جينات مستزرعة فى خلايا الثدييات . ويؤدى إندماج

البروتوبلاستات البكتيرية ، والتى جهزت من سلالة بكتيرية تحمل بلازميداً به جين مُولَج مع خلايا ثدييات إلى تواجد البلازميد (المطعم) فى خلية الكائن الثديى . ويسمح هذا بدراسة تعبير الجينات المستزرعة فى خلايا الثدييات . وعلى الرغم من ذلك فإن البلازميد البكتيرى يتناسخ فقط فى البكتريات المناسبة ولا يتناسخ فى خلايا الثدييات ، ولذلك فعندما تنقسم خلايا الثدييات هذه ، فإن البلازميد يُفقَد بسرعة من العشيرة . ومن الواضح أن هذا التكنيك غير مناسب فى التجارب على المدى البعيد .

٥ـ ٣ : الموجهات الڤيروسية لاستزراع الجينات فى خلايا الثدييات :

يستعمل كل من الدن أ البلازميدى والڤيروسى كموجّهات لاستزراع الجينات فى البكتريات ، ومن ثم فمن الطبيعى أن يأخذ علماء البيولوجيا الجزيئية فى الاعتبار ما إذا كانت توجد أية بلازميدات " داخلية النمو " أو ڤيروسات ، قد تخدم كموجّهات فى خلايا الثدييات . ولسوء الحظ ، فالبلازميدات " داخلية النمو " لم يتم التعرف عليها بعد فى الخلايا مميزات النوى ، لكن قد طُوّرت عديد من الڤيروسات كموجهات إستزراع . وأحد هذه الڤيروسات شائعة الاستعمال هو الڤيروس SV40 أو ما يسمى بڤيروس سيميان ـ ٤٠ (Simian Virus 40).

فعندما يصيب ڤيروس سيميان ـ ٤٠ خلايا ثدييات نامية فى مستنبت ، فإنه يدخل فى سلسلتين مختلفتين مميزتين من الأحداث، ويتوقف ذلك على طبيعة الخلايا . فعندما يضاف لخطوط خلايا قرد معينة (مضيفات مُجيزة) فإنه يمارس دورة حياة ڤيروسية تقليدية تؤدى إلى تحلل الخلية وموتها . فعند بداية العدوى تدخل المادة الوراثية الڤيروسية فى النواة وبعض من جيناتها (الجينات المبكرة التعبير) تعبر عن نفسها. ويؤدى هذا إلى دخول الدن أ الڤيروسى فى التناسخ بعد حوالى ثمانى ساعات . وبعد ذلك ، فإن الجينات الڤيروسية الأخر (الجينات متأخرة التعبير) تعبر عن نفسها وتحدد البروتينات الڤيروسية التركيبية . وبعد حوالى ٣٦ ساعة تنطلق جسيمات النسل الڤيروسية وتتلف الخلية . ويُسمى هذا التتابع من الأحداث " الدورة التحليلية (Lytic cycle).

أما إذا حدثت عدوى بالڤيروس سيميان ــ ٤٠ لخلايا فأر أو جرذ نامية فى مستنبتات (مضيفات غير مجيزة) ، فإن الدورة التحليلية لا تحدث ، لأن الخلايا تكون غير قادرة على تعضيد تناسخ الدنأ الڤيروسى . ومن ثم فالغالبية العظمى من خلايا الفأر أو الجرذ لاتتأثر بالعدوى الڤيروسية . وبالرغم من ذلك فبعض الخلايا ــ أحيانا ــ تدمج المادة الوراثية لڤيروس سيميان ــ ٤٠ فى كروموسوماتها مما يؤدى إلى حالة سرطان (أنظر ص ٤٩ ــ الشكل ٤ ــ ٤) .

لقد درست البيولوجيا الجزيئية لڤيروس سيميان ــ ٤٠ باستفاضة لعدة سنوات ، وهذا يجعلها إختيارا واضحا ــ لا تردد فيه ــ لبناء مُوجّهات إستزراع لخلايا الثدييات. وتتكون الهيئة الجينية الڤيروسية من جزىء دنأ واحد مزدوج الخيط دائرى الشكل ، يبلغ ٥٢٤٣ زوج من القواعد طولا . كما أن التتابع الكلى لقواعده معروف تماما ، كما يوجد به عدة مواقع مفيدة يمكن لانزيمات القطع الداخلنووية أن تقطعها وتفتح الدائرة " الكروموسومية " قبيل إيلاج شظية من الدنأ الغريب .

ويمكن استعمال ڤيروس " سيميان ــ ٤٠ " كموجّه إستزراع فى خلايا " مضيفة مجيزة " أو فى خلايا " مضيفة غير مجيزة " . ففى الحالة الأولى ، تولج الجينات الغريبة فى الكروموسوم الڤيروسى فى الأنبوب ، ثم بعد ذلك تدمج فى كروموسومات خلايا ثدييات مع دنأ الڤيروس " سيميان ــ ٤٠ " فى نفس الوقت ، أثناء العدوى . وفى البداية تبدو هذه الطريقة ذات فائدة وذلك لأن الدنأ الغريب يتناسخ مع الكروموسوم ، ولكن توجد الآن بعض التحفظات . وأحد المشاكل التى برزت هى أن إندماج دنأ الڤيروس " سيميان ــ ٤٠ " يكون مصحوبا بسلسلة معقدة من التغيرات الكروموسومية ، وهذا يجعل من المستحيل معرفة كيف تنتظم الجينات المستزرعة ، كما يجعل من الصعوبة تفسير نتائج الدراسات الخاصة بطريقة تعبير جيناتها عن نفسها . وبناء على ذلك فإن الدراسة قد كثفت على استزراع الڤيروس " سيميان ــ ٤٠ فى "مضيفات مجيزة " .

فإذا ما أولجت جينات غريبة فى ڤيروس" سيميان ــ ٤٠ " ــ فى الأنبوب ــ ثم أجريت

عدوى لضيف مجيز ، فإن الجين المولَج يتناسخ فى نفس الوقت ـ مع بقية الهيئة الجينية الڤيروسية لانتاج حوالى من ١٠٫٠٠٠ إلى ١٠٠٫٠٠٠ نسخة . ولما كان جزئ الد ن أ الهجين (ڤيروس سيميان ـ ٤٠ + الد ن أ الغريب) يجب أن يُحَرّ فى غلاف بروتينى لاحداث العدوى ، فلابد أن يكون هناك حد للحجم الكلى لجزئ الد ن ا المطعم الذى يمكن إستعماله (أنظر ص ٥٢) . لذلك كان من الضرورى استبعاد بعض الجينات من كروموسوم الڤيروس سيميان ـ ٤٠ لاعطاء متسع للد ن ا الغريب . وبالتالى لما كان الڤيروس " سيميان ـ ٤٠ " ينقصه بعض الجينات فإن الأمر يتطلب إجراء عدوى متزامنة بڤيروس " مساعد " والذى وظيفته فى هذه الحالة هى تعويض النواقص فى الڤيروس الأساسى .

وعندما يُولَج الجين الغريب فى موضع مناسب فى الهيئة الجينية لڤيروس " سيميان ـ ٤٠ " فإنه يُعبّر عن نفسه فى نفس الوقت ـ مع جينات الڤيروس " سيميان ـ ٤٠ " أثناء العدوى لخلايا " ضيفة مجيزة " . ويستعمل هذا النظام لدراسة تعبير كثير من الجينات فى خلايا الثدييات ، وضمنها جينات جلوبين الأرنب والانسولين الأولى للجرذ . إلا أن هذا النظر له عيب خطير وهو أن خلايا المضيف تقتَل أثناء دورة العدوى . وقد أدى ذلك إلى جعل عديد من الباحثين يحاولون عمل " موجهات مُخلّقة صناعيا " يمكنها التناسخ فى خلايا الثدييات بدون أن تقتلها .

٥ ـ ٤ : الموجهات المُخلّقة صناعيا لاستزراع الجينات فى خلايا الثدييات :

لقد شيد كل من ر . س . مولليجان و ب . بيرج ـ من جامعة ستانفورد ـ كاليفورنيا ـ سلسلة من " الموجهات " كلا منها يحتوى على شظايا من الد ن أ من الهيئة الجينية لڤيروس سيميان ـ ٤٠ من كروموسوم بكتيرى وكذلك من بلازميد بكتيرى . والنتيجة النهائية هى موجهات سوف تتكاثر إما فى خلايا ثدييات أو فى بكتريات دون أن تقتلها . كما أنها تحتوى على جينات تمكنها من أن تُنتخب إما فى خلايا ثدييات أو بكتريات . وفى الشكل ٥ ـ ٣ نعرض نموذجا لأحد هذه الموجهات والأجزاء التى يتكون منها :

منشأ تناسخ الد ن أ فى الخلايا البكتيرية
جين AmpR
منشأ تناسخ الد ن أ فى خلايا الثدييات
جينات SV40 التى تحفز تناسخ الد ن أ
جين E.coli XGPRT

الشكل ٥ ـ ٣ :

موجّه استزراع لخلايا الثدييات خُلق صناعيا بمعرفة العالم مولليجان والعالم بيرج . المناطق المخططة مشتقة من ڤيروس SV40 (سيميان ـ ٤٠) . المناطق المظللة مشتقة من البلازميد البكتيرى pBR 322 . المناطق المنقطة مشتقة من كروموسوم بكتريا القولون .

(١) إن تناسخ جزيئات الد ن أ داخل الخلايا يمكن فقط أن يُستَهل من تتابع قواعد محدد يسمى "منشأ" تناسخ الد ن أ . ويوجد منشأ تناسخ الڤيروس سيميان ــ ٤٠ فى الموجه ليسمح له بالتناسخ فى " ضيف مجيز ". وبعض الجينات والتى هى ضرورية لتناسخ د ن أ الڤيروس سيميان ــ ٤٠ موجودة أيضا ، لكن الجينات اللازمة لبقية الدورة التحليلية للڤيروس غائبة ، ويترتب على ذلك أن الخلايا المضيفة لا تتلف .

(٢) يوجد أيضا فى هذا الوسيط المُخَلَّق صناعيا جين من بكتريا القولون (إ . كولاى) يسيطر شفريا على الانزيم زانثين ــ جوانين فوسفور يبوسيل ترانسفريز XGPRT ، وهذا بدوره يوفّر وسيلة إنتخاب لالتقاط الوسيط إلى داخل خلايا الثدييات . وبالرغم من أن هذا الانزيم مختلف قليلا عن إنزيم الثدييات HGPRT والذى سبق مناقشته (ص ١٢) ، إلا أنه يقوم بوظيفة مماثلة ، وانه لو كانت مزرعة الخلايا المضيفة سالبة للانزيم $HGPRT^-$ فان تلك الخلايا والتى إلتقطت الموجه (بما فيه الجين $XGPRT^-$) تنقلب من السالب الى الموجب (من $HGPRT^-$ الى $HGPRT^+$) . وهذا يوفر وسيلة للانتخاب المُوجب للخلايا الحاملة للموجّه ، وذلك بفردها على سطح من بيئة هات HAT (أنظر ص ١٥)

(٣) المقطع الأخير للموجه المُخلّق صناعيا مشتق من بلازميد بكتيرى يسمى pBR322 وهذا المقطع له شكلان ، فيوجد منشأ لتناسخ الد ن أ سوف يكون فعالا فى البكتريات مما يمكن الموجه من الاستمرارية فى البكتريات مثل بلازميد بكتيرى عادى . كما يوجد أيضا جين لمقاومة المضاد الحيوى " أمبسللين " وهذا يمكّن الموجه من التواجد فى الخلايا البكتيرية لكى يسهل إنتخابها وذلك بنشرها على بيئة حاوية لهذا العقار .

ومجمل القول أن ذلك يوفر موجهاً بمميزات تكنولوجية عالية القيمة بالنسبة

لكروموسوم ڤيروس سيميان SV40 الأساسى . ويمكن إبقاوه باستمرار فى البكتريا على فترات عندما يخضع للتداول (على سبيل المثال ، عندما يحتوى على تتابعات د ن أ مُولَجة أو مُبدَّلَة) . وعندما تحتاج لدراسة تعبير الجينات المُولَجة أو عند الحاجة للبروتين المُسيطَر عليه شفريا بهذه الجينات ، فإن الموجه يمكن نقله مباشرة إلى خلايا ثديية يستديم فيها دون أن يحطمها . إن تشييد مُوجِهّات من هذا النوع يعنى أن استزراع الجينات فى خلايا الثدييات قد دخل مرحلة ذات أهمية كبرى معادلة لعمليات إستزراع الجينات فى الخلايا البكتيرية والتى دخلت حيز التنفيذ منذ سنين قليلة مضت .

الباب السادس

دمج الجينات فى حيوانات كاملة

٦ـ١ : مقدمة :

فى البابين السابقين إستعرضنا التكنيكات الخاصة بإدخال مواد وراثية فى خلايا ثدييات نامية فى مزارع • فهل من الممكن تطويع هذه التكنيكات لإدخال مواد وراثية جديدة فى كائنات كاملة ؟ هناك عدة أسباب عامة تجعل من هذا الموضوع هدفا عظيما لعلماء الهندسة الوراثية •

إن الميكانيكيات التى تحكم تمايز الخلايا إلى انسجة وأعضاء فى الكائنات الحية تمثل أكثر المشاكل تحديا وصعوبة لعلم البيولوجيا فى وقتنا الحاضر • فكثير من الجينات تُعَبّر عن نفسها فقط فى أطوار محددة أثناء النمو وفى أنسجة معينة • ومن الواضح أنه من غير المناسب تحليل هذه المشاكل فى مزارع الخلايا • وبالرغم من ذلك ، لو أمكن إدخال المادة الوراثية العادية فى كائنات كاملة ، فقد يكون من الممكن أيضا إدخال مواد وراثية طافرة أو مواد وراثية محورة كيميائيا إلى داخل كائن ما ، ثم بعد ذلك نلاحظ الآثار المترتبة بالنسبة لتعبير الجينات أثناء النمو • وبعد ذلك يمكن إيجاد تلازم بين تتابعات قواعد محددة مع طُرز من أنشطة الجينات فى كل الكائن •

كما أن علماء الوراثة شغوفين لإدخال جينات فى حيوانات كاملة لأسباب أُخَر مختلفة • وقد يكون ذلك تكنيكا مفيدا فى تحسين التراكيب الوراثية لحيوانات المزرعة • فعلى سبيل المثال ، لو أمكن إدخال جين يؤدى لزيادة إنتاجية هرمون النمو ، فقد يؤدى ذلك إلى حيوانات تنمو أسرع وهذا هدف مرغوب لدى المزارعين يوفر قدرات هائلة لمجال جديد شامل يضاف إلى علم تربية الحيوان •

فإذا توافرت تكنيكات لادخال جينات فى الحيوانات الثديية ـ فهل يكون من الممكن أن نستعمل تكنيكات مشابهة لادخال جينات فى الآدميين ؟ من المعروف أنه يوجد أكثر من ٢٠٠٠ من الأمراض الآدمية لها أساس وراثى ، وقد يكون من الممكن علاج بعضها بالمعالجة الجينية بدلا من معالجة الأعراض التى تنشأ من الجين المعيب . ومن الممكن أن نتصور طرازين أساسيين مختلفين من المعالجة الجينية . ففى الحالة الأولى ، قد يكون الهدف إيلاج جينات "صحيحة" فى أنسجة جسدية لمريض ما من غير أن يكون هناك تأثيرات على نسله (أو نسلها) . وفى الحالة الثانية ، قد تكون الاستراتيجية إيلاج جينات فى جنين ، ثم إعادة زرع هذا الجنين فى رحم الأم . وحاليا يقوم الأطباء بتطوير تكنيكات لاجراء عملية الاخصاب فى الأنبوب وزرع الأجنة للتغلب على أنواع معينة من العقم الآدمى . كما أن تطوير هذه التكنيكات ربما يكون له أيضا ضمنيات هامة إذا قُدِّر للمعالجة الجينية أن تحقق .

وتجرى حاليا دراسة عدة مجالات مختلفة ، تختص بادخال المادة الوراثية فى كائنات كاملة ، وسوف نتناول أهمها فى هذا الباب . إن البحث فى هذا المجال له ضمنيات أخلاقية وأدبية على درجة كبيرة من الأهمية ، لدرجة أنه من الضرورى للأفراد والجماعات والحكومات أن تناقش هذا الأمر . وليس ضمن نطاق هذا الكتاب أن نناقش ذلك ، لكن من المؤكد أننا سوف نعرض لبعض الحقائق الأساسية لهذه المناقشات الهامة .

٦ـ٢ : إستبدال خلايا نخاع العظام فى الحيوانات :

يمكن سحب بعض طُرز من الخلايا (مثلا خلايا نخاع العظام) من جسم حيوان وتنمى فى مزرعة ثم بعد ذلك تعاد مرة أخرى إلى جسم الحيوان . فهل من الممكن إستعمال تكنيكات مماثلة لتلك التى سبق وصفها فى الباب الرابع ، لادخال د ن أ غريب إلى هذه الخلايا وهى خارج الجسد لتحوير الجينات الخاصة ببعض الخلايا الجسمية ؟

فى عام ١٩٨٠ نشر العالم م ٠ ج ٠ كلاين من جامعة كاليفورنيا ــ أبحاثا لتجارب من هذا النوع ــ فلقد سحبت خلايا نخاع العظم من فأر وعرضت إلى د ن أ محتوى على جين يتحكم فى المقاومة لعقار طبى مضاد للسرطان يسمى " ميثوتريكسات " Methotrexate ، فالتقطت بعض هذه الخلايا الـ د ن أ، وترتب على ذلك أن أصبحت مقاومة للميثوتريكسان وبعد ذلك أعيدت الخلايا الى جسد الحيوان ، ثم اعطى الحيوان جرعات من الميثوتريكسات لفترة من الزمن (بهدف إعطاء ميزة إنتخابية للخلايا المقاومة للميثوتريكسات فى خليط من الخلايا المقاومة والخلايا الحساسة)٠ وكانت النتائج مثيرة ، فقد أصبحت الفئران قادرة على تحمل جرعات عالية من الميثوتريكسات أكثر من أفراد المقارنة والتى لم تأخذ خلايا نخاعها د ن أ الجين الخاص بالمناعة ٠

هذه التجربة لها إعتبارات طبية غاية فى الأهمية لمعالجة مرضى السرطان من الآدميين بعقاقير طبية مثل الميثوتريكسات كثيرا ما يعوق لأن العقار الطبى يقتل عددا كبيرا من خلايا نخاع العظم الضرورية قبل أن يقتل كل خلايا السرطان فى الجسم ٠ فهل من الممكن إزالة خلايا النخاع من المرضى قبل المعالجة بالعقار ، ثم تحويلها وراثيا إلى خلايا مقاومة للعقار ، ثم إعادتها بعد ذلك إلى الجسم ؟ لو تحقق ذلك ، فإن الفرد المريض سوف يكون قادرا على تحمل تركيزات أعلى (أكثر تأثيرا) من العقار المضاد للسرطان ، مع آثار جانبية أقل ضررا ٠

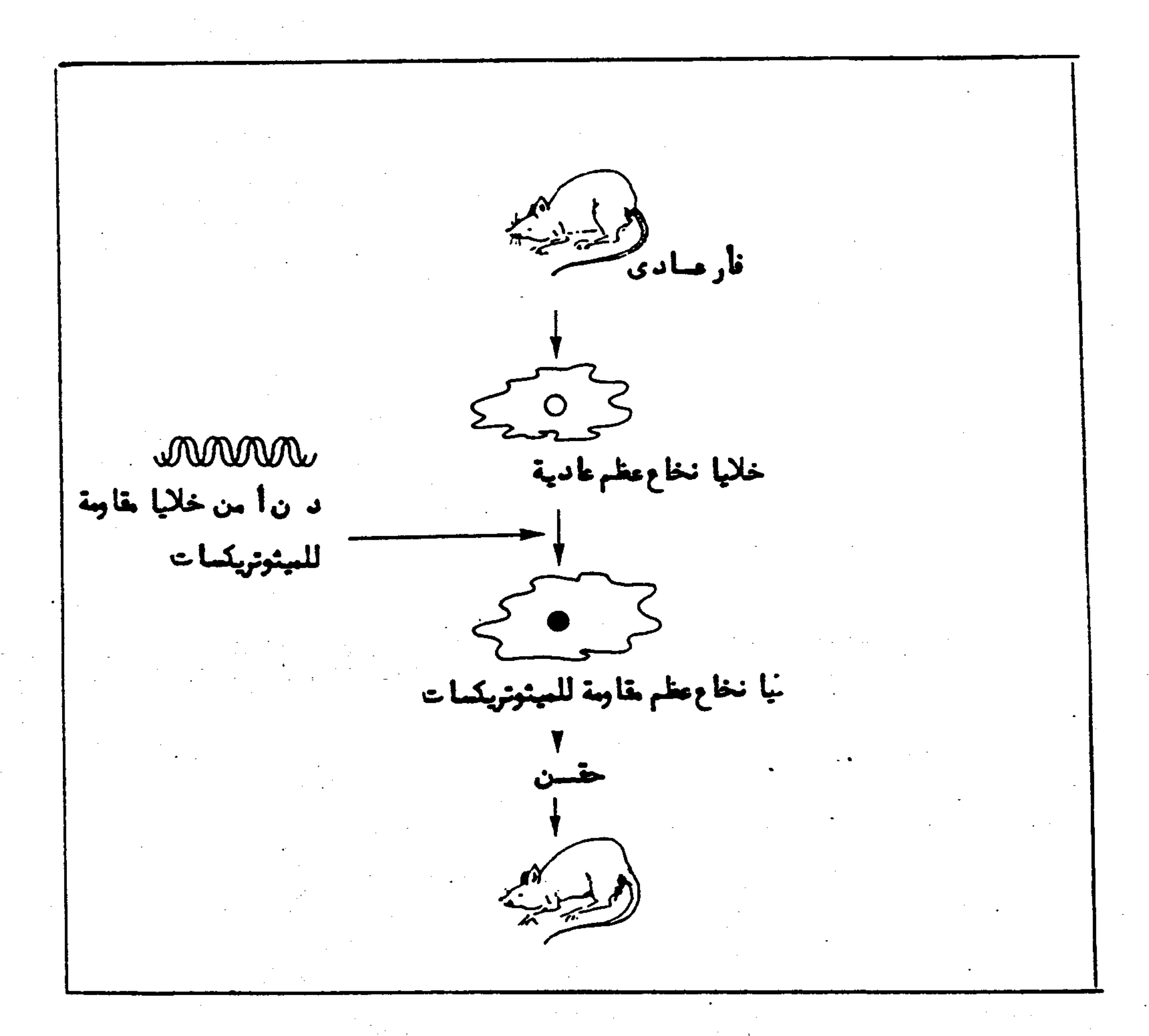
لقد كان العالم كلاين مهتما باعتبارات أخرى ذات إمكانية طبية هامة لتجاربه ٠ نكثير من الفاقات (الأنيميات) الوراثية الخطيرة تنتج من عيوب فى جينات الجلوبين ٠ وأحد هذه الأمراض هو فاقة البيتا زيرو (beta-zero thalassaemia). لقد اعتقد كلاين أنه إذا كان ممكنا أن يولج جين سليم فى خلايا نخاع مريض بهذه الفاقة ، ثم بعد ذلك تعاد الخلايا (التى عولجت وراثيا) إلى جسد الشخص المريض، فإن ذلك قد يكون ذا فائدة طبية كبرى ٠ إلا أن مجلس الأعراف الطبية فى جامعته بكاليفورنيا لم يقتنع بأن الوقت قد حان لمحاولة إجراء هذه المعالجة، ورفض إعطاءه الموافقة

على ذلك . لقد كان هناك إدعاء بأن تجارب الحيوانات المعملية لم تعطِ بعد دلائل كافية على أن جين الجلوبين يمكنه أن يعبر عن نفسه بمستويات ذات فائدة في الشخص المريض ، كما أن كلاين اقترح أن يولّج الجين على هيئة جزئ د ن أ مطعم . فيوصل جين الجلوبين باستخدام تكنيكات الد ن أ المطعم ـ بجين ڤيروسي للثيميدين كينيز ، لأن هذا الجين الڤيروسي أكثر كفاءة من قرينه ذى المصدر الثديى ، ولذلك فربما يُضفى ميزة إنتخابية على الخلايا التى تحمله مع جين الجلوبين المتلازم معه . وبالرغم من ذلك.فإن سلطات الولايات المتحدة الأمريكية لا تجيز إستعمال أى جزيئات د ن أ مطعمة للمعالجة الآدمية حتى الآن .

ولكى يتحايل كلاين على القيود المفروضة فى وطنه ، فقد حاول كلاين العلاج التجريبى (بدون أى نجاح) على مرضى فى إسرائيل وفى إيطاليا . وعندما انكشف الأمر للرأى العام ، ثار جدال ونقاش لا حد لهما . وفى تحرك غير عادى لمعاهد الصحة القومية الأمريكية ـ وُجّهت تحذيرات للعلماء الآخرين بعدم تجاهل القيود المطبقة عليهم ، وقامت بسحب التمويل المقدم لهم فى هذا المجال . وحاليا تقوم المجموعات البحثية الأخرى بالاستمرار فى تجارب الحيوانات المعملية . ويبدو من المحتمل أنّ نوعا مماثلا من المعالجة الجينية الآدمية سوف تجرى محاولتها فى العالم خلال السنوات القليلة القادمة .

٦ـ٣ : دمج الخلايا المزروعة داخل الأجنة :

تختلف الطريقة الثانية لادخال جينات غريبة فى حيوانات كاملة جوهريا عن الطريقة التى حاول بها العالم كلاين ، لأنها تشمل التجريب فى الأجنة . فقد لاحظ علماء البيولوجيا التكوينية ـ مثل ب . منتز ـ أنه لو حُقِنَت خلايا سرطانية معينة لفار تسمى " تيراتوكارسينوماس " teratocarcinomas فى أجنة مبكرة للفار فى طور البلاستوسيست belastocyst فإن بعضا من هذه الخلايا يصبح مندمجا فى الجنين كجزء كامل منه . فإذا ما أعيدت زراعة الجنين فى أم حاضنة ، فإن فئران النسل تكون مبرقشة (موزايكات) متكونة غالبا من أنسجة مشتقة من خلايا البلاستوسيست الأولية ،



الشكل ٦ ـ ١ :

بيان تخطيطى لتجربة أجريت بواسطة العالم كلاين لإدخال جين لمقاومة العقار الطبى المضاد للسرطان "ميثوتريكسات" فى خلايا نخاع العظم فى الأنبوب ـ ثم بعد ذلك تعاد الخلايا إلى الحيوان الكامل ·

لكن ببعض المناطق الناتجة من خلايا التيراتوكارسينوما التي حُقِنَت (الشكل ٦ ـ ٢) . (ويمكن التعرف على الأصول المختلفة للأنسجة لأن طرازى الخلايا يحملان واسمات وراثية مختلفة . وأكثر هذه الواسمات وضوحا هو لون الفراء ، وخلايا التيراتوكارسينوما قد تكون أصلا مشتقة من فأر أجوتى اللون ، وأن خلايا البلاستوسيست من آباء سود أجوتية أصيلة للون الفراء . ويكون الموازيك الناتج أسوداً ببقع أجوتية) . وبالرغم من أن التيراتوكارسينوما هى خلايا سرطانية ، فإنه من الغريب أنّ النسل المبرقش لا يكون حاملا للسرطان ، مما يعنى حدوث إنعكاس فى التعبير للمظهر السرطانى .

وأحيانا تندمج خلية " تيراتوكارسينوما " محقونة فى غدد الجنين الموازيك النامى ؛ وهذا يضيف بُعداً جديداً لهذه الحالة . وعندما يحدث ذلك ، ربما تتكون جاميطات تكون مشتقة من خط خلايا التيراتوكارسينوما . فإذا ما هُجِّنت هذه الموازيكات مع فئران عادية فإن نسلها ، وكذلك الأجيال التالية ترث جينات مشتقة أصلا من " الكارسينوما " بنسب متدلية عادية .

وقد يرغب علماء الوراثة التكوينية فى توسيع مجال العمل بدرجة أكبر . فقد يكون ممكنا أن تُولَج جينات (سبق معالجتها بأى طريقة نحتاجها باستعمال تكنولوجيا الدنا المطعم) فى خلايا " تيراتوكارسينوما " باستعمال التكنيكات التى سبق شرحها فى الباب السابق . وبعد مايتم دمج خلايا " التيراتوكارسينوما " فى الفئران ونسلها فقد يكون من الممكن أن تدرس تأثيرات أى نوع من الطفرات على العمليات التكوينية فى الحيوان ككل .

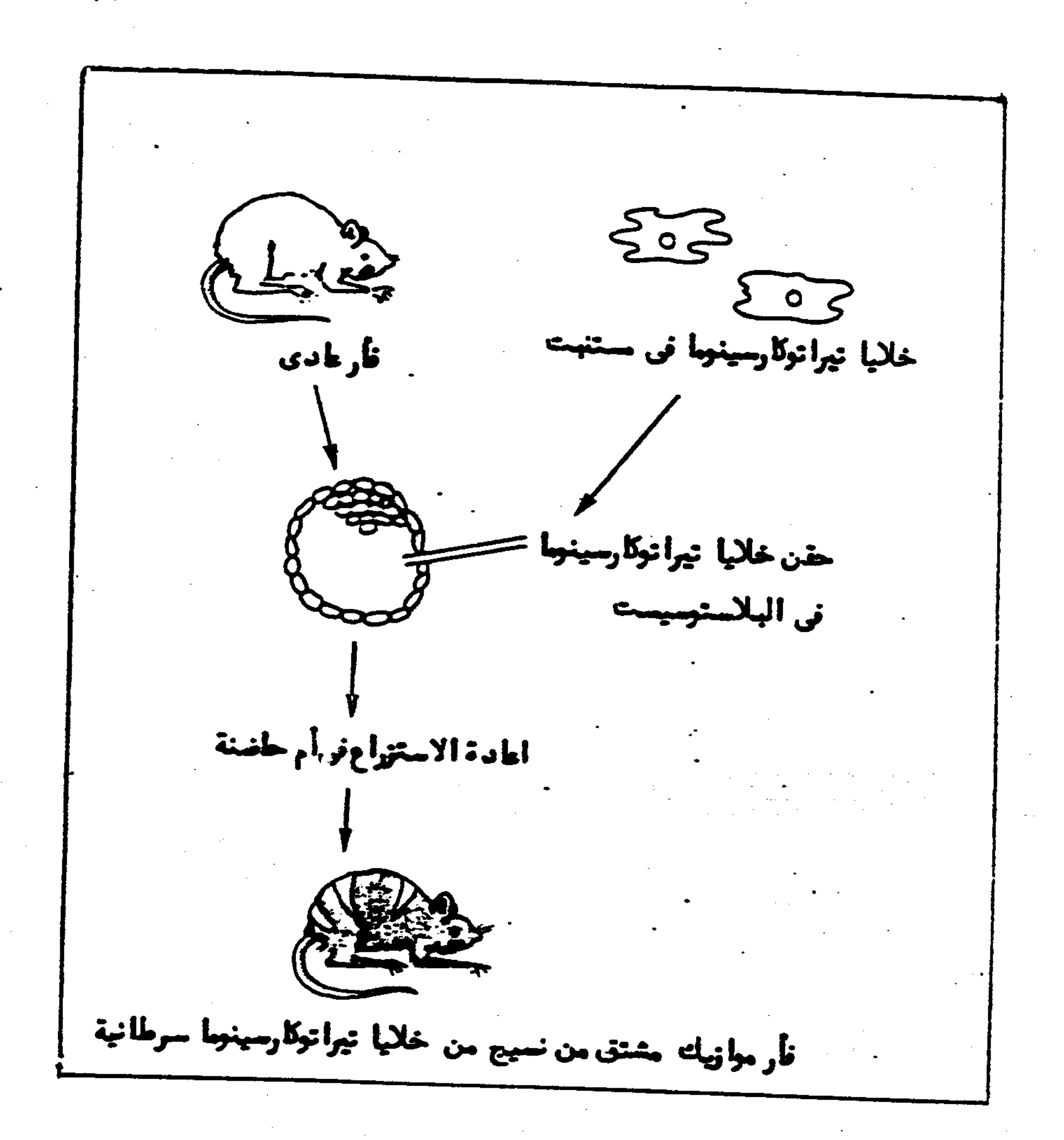
ونظام " التيراتوكارسينوما " قابل فقط للتطبيق على الفئران فى الوقت الحاضر . ومن المتصور أنّ نظاما تجريبيا مماثلا سوف يُطَوَّر فى المستقبل للحيوانات الأُخَر ذات الأهمية الزراعية ، مما يوفر طريقة لادخال جينات جديدة فى قطعان هذه الحيوانات . وسوف يكون من المهم ، وأينما من الصعب أن نتأكد أن الجينات الجديدة التى تدخل فى الحيوانات سوف تعبر عن نفسها بطريقة صحيحة . إن الطرق التى تُنَظَّم بها أنشطة

الجينات أثناء النمو مازالت غير معروفة بشكل واضح • وللحصول على تنظيم جينى سليم ، فمن الممكن أن بعض الجينات إما أن تُولَج فى مواقع كروموسومية محددة أو على الأقل مع تتابعات قواعد جانبية مركزة •

٦ــ٤ : إيلاج الد ن أ فى الأجنة باستعمال الڤيروسات :

لقد درس عدد من علماء الهندسة الوراثية إمكانية محاولة إدخال مواد وراثية جديدة فى أجنة باستعمال موجهات ڤيروسية • فلقد بين العالم يينش R.Jaenisch ومساعدوه فى جامعة هامبورج بألمانيا الغربية ، أن تتابعات الد ن أ الڤيروسى لوكيميا مولونى (Moloney leukaemia) يمكن إدماجها فى كروموسومات الفأر عقب عدوى الأجنة • ويمكن إحداث العدوى إما بواسطة التحضين المشترك للجنين مع خلايا أخر منتجة للڤيروس ، أو بواسطة الحقن الدقيق للڤيروس فى البلاستوسيست • وعندما تعدى أجنة الفئران وهى فى طور من ٤ ــ ١٦ خلية ، ثم بعد ذلك يعاد زرعها فى أمهات حاضنة ، فإن نسبة عالية من الفئران الناتجة تكون مبرقشة (موزايكات) ، أى حيوانات مكونة من خليط من الخلايا ، بعضها يحتوى على تتابع من د ن ا الڤيروس اندمجت فى الكروموسوم ، وبعض الخلايا تكون غير محتوية على هذا التتابع • ويفترض أن هذا يعتمد على أىّ من الخلايا السلفية قد أصيب بالعدوى أثناء التجربة • وفى بعض الحيوانات ، فإن تتابع الد ن ا الڤيروسى قد يندمج فى الخلايا الجرثومية وبعد ذلك ربما يتوارث كجين مندلى عادى فى الأجيال التالية ، ومن ثم فإن مادة وراثية جديدة قد أدخلت فى الكائن •

ويبدو أنه من الممكن أن توسع تجارب العالم يينش باستعمال تكنيكات الد ن أ المطعم لوصل جينات إضافية للمادة الوراثية الڤيروسية قبل إحداث العدوى فى الأجنة ، ويجب أن يحمل الڤيروس الجينات "الجديدة" معه إلى الكروموسوم، وبالرغم من ذلك قد تنشأ نفس المشكلة التى ذكرت فى الجزء ٦ ــ ٣ (ص ٦٥) لأنه فى تجارب يينش تذهب



الشكل ٦ ــ ٢ :

رسم تخطيطى لتجربة العالم مينتز تشمل حقن خلايا " تيراتوكارسينوما " فى جنين فأر . تحمل كل من خلايا التيراتوكارسينوما والجنين جينات مختلفة للون الفراء . ويرى فى الصورة فأر موازيك ناتج بعضه من نسيج مشتق من الخلايا السرطانية (التيراتوكارسينوما).

تتابعات د ن ا الڤيروس في مواضع مختلفة على كروموسومات الفأر ، ويترتب على ذلك أن تحدث تعبيراتها بمستويات متباينة في الأنسجة المختلفة في مختلف الأفراد . (وفي هذه التجربة يقدر تعبير الجينات القيروسية بقياس تتابعات الد ن ا التي تنسخ منها . ويمكن إجراء ذلك بواسطة تكنيكات البيولوجيا الجزيئية) . وما زال من الصعب في الوقت الحاضر ، توجيه الڤيروس إلى موقع محدد ، والذي قد يكون من الضروري أن يحدث للتأكد من أن الجينات التي يحملها تعبر عن نفسها على المستوى المناسب في أنسجة معينة . ويمكّن الوضع الحالي فقط من إيلاج جينات بطريقة عشوائية ثم بعد ذلك ننتظر لنرى كيف يمكنها أن تعبر عن نفسها .

٦ــ٥ : إيلاج الد ن ا في الأجنة باستعمال الحقن الدقيق :

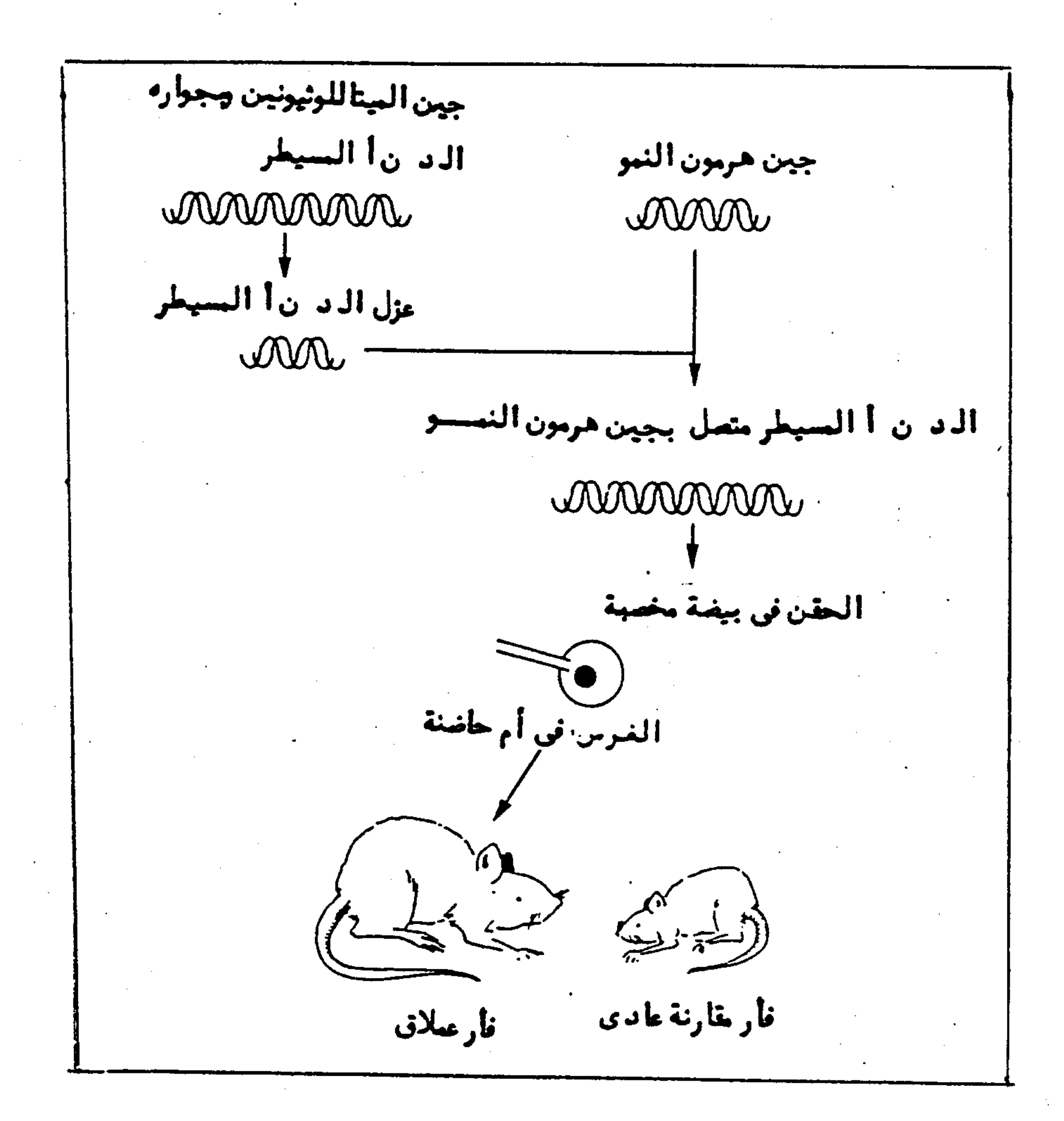
لقد ذكرنا في الجزء ٤ ــ ٣ أن الحقن الدقيق للجينات قد جعل التقاط الد ن ا داخل خلايا الثدييات النامية في المستنبتات أكثر كفاءة بالمقارنة بجعل الخلايا تأخذ الد ن ا من البيئة المحيطة بها . ويطبق هذا العمل المباشر حاليا في إيلاج الجينات في البيض الملقح . ولقد بين العالم ج . و . جوردون ومعاونوه بجامعة ييل Yale أنه عندما حقنت تتابعات د ن ا في النوى الأولي للخلايا البيضية المخصبة للفأر ، ثم بعد ذلك زرعت هذه الخلايا البيضية في أمهات حاضنات، فإن اثنين من ٧٨ فأرا نتجت احتويا على تتابعات الد ن ا الجديد (المحقون) ، والتي اندمجت في كروموسوماتها . وكما أفاد هذا الفريق البحثي ، فإن تتابعات الد ن ا الجديدة كانت موجودة في جميع خلايا هذه الحيوانات لدرجة أن ذلك قد يجعلنا نتوقع أن الحقن قد أجري قبل أن تبدأ البيضة في الانقسام .

وفي عام ١٩٨١ بين كل من العالمين ف . قسطنطين و إ . لاسي من جامعة أكسفورد ، أنه ليس فقط الد ن ا المحقون هو الذي كان موجودا في الفئران التي تنمو بعد ذلك ، لكن أيضا هذه الفئران يمكنها أن تورّث تلك التتابعات من الد ن ا لنسلها

عندما تهجس من فئران عادية . ولقد أمكنهم إيضاح ذلك بواسطة حقن جين بيتاجلوبين الارنب β-globin (والذى يمكن تمييزه من نظيره الخاص بالفأر باستعمال تكنيكات البيولوجيا الجزيئية) فى بيضات فأر مخصبة ، ثم دراسة الفئران الناتجة وأنسالها. بعد ذلك قام إ . ف . واجنر من مركز أبحاث فوكس شيز للسرطان بفلادلفيا ، بتوسيع هذه الملاحظات أكثر ، ببيان أن جين بيتاجلوبين الأرنب المولَج يمكن أن يستعمل على الأقل — فى تحديد بعض طرز بروتينات الأرنب داخل خلايا الدم الحُمر للفأر . وتضع هذه الدراسات فى مجملها الأساس الراسخ للنقطتين الجوهريتين واللتين هما أن الجينات المحقونة يمكنها أن تتوارث ويمكنها أن تعطى تعبيراتها .

إن الاستفادة العملية الممكنة من مثل هذا النوع من التجارب المثيرة ، قد اقتربت أكثر فى عام ١٩٨٢ ، عندما أعلن كل من ر . د . بالميتر و ر . أى . برينشتر من جامعتى واشنطون وبنسلفانيا تَقدُّماً ملحوظا فى هذا المجال . فقد حقنا جين جرذ يسيطر شفريا على هرمون النمو فى بيض فأر مخصب . ولقد اختلفت التجربة عن مثيلاتها السابقات فى كون أن الجين المحقون كان قد وُصِّل بواسطة تكنيكات الد ن أ المطعم مع قطعة د ن أ قبل الحقن . وكانت شظية الد ن أ هذه تتابعا كان فى الأصل مجاورا لجين "الميتاللوثيونين " فى الفأر (الشكل ٦ — ٣) . والميتاللوثيونين هو بروتين يرتبط مع ذرات المعادن الثقيلة ، وبسلوكه هذا فإنه يضفى مناعة على تأثيراتها السامة . والنقطة المهمة التى يجب ذكرها عنه هنا هى أن مستوى التعبير للجين (أى معدل إنتاج الد م ر ن أ ، وبالتالى تخليق الميتاللوثيونين) يمكن ان يتغير . فالمستويات العليا من الزنك فى الخلية تؤدى إلى مستويات عُليا من تعبير الجين ، إلا أن الميكانيكية الجزيئية لذلك ليست واضحة ، لكن النقطة المهمة التى يجب ذكرها هنا هى أن حوالى ٩٠ قاعدة من الد ن ا المجاور للجين تكون ضرورية لتأثير الزنك على تعبير هذا الجين .

لقد وصّل العالمان بالميتر وبرينشتين هذه القواعد التسعين لطرف جين هرمون النمو



الشكل ٦ ــ ٣ :

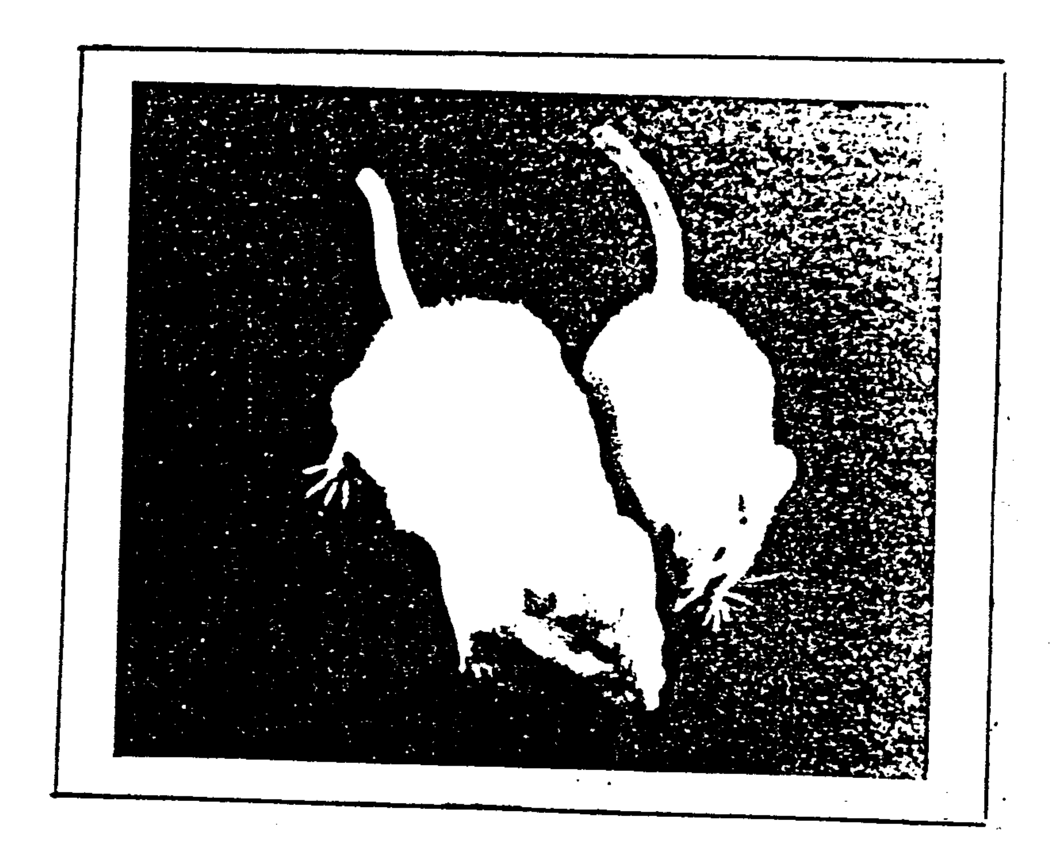
حقن جين هرمـون النمو المرتبط مع تتابع مسـيطر فى بيض فأر ــ للتفاصيل أنظر الموضــوع .

ثم بعد ذلك حقنا جزئ الـ د ن ا المطعم فى بيض مخصب للفأر . ولقد أدمجت بعض الفئران الناتجة جزئ الـ د ن ا المطعم هذا فى كروموسوماتها . ولقد غذيت هذه الفئران على وجبة تحتوى على نسبة عالية من الزنك ، كما أنه من الواضح أن الزنك قد تداخل مع منطقة أزواج القواعد التسعين وأزاد تعبير الجين المجاور ، مما نتج عنه أن الفئران كانت تحتوى فى أنسجتها على ٨٠٠ مرة من الهرمون أكثر من مستوى الهرمون العادى . وترتب على ذلك أنها نمت بسرعة عالية جدا حوالى ضعف الحجم العادى (الشكل ٦ ــ ٤) .

وتشمل هذه الدراسة مضامين واضحة كتكنولوجيا لاستحداث النمو السريع للحيوانات ذات القيمة الاقتصادية . والفائدة الناتجة من ذلك هى فترة إنتاج أقصر ، وربما زيادة كفاءة إستعمال الغذاء . ولربما يكون مفيدا بوجه خاص أن نتحصل على جين يمكن أن نتحكم فى تغيير نشاطه بالايجاب أو السلب بتنظيم مستويات الزنك فى الحيوانات ، وذلك بالتغيير فى محتوى عنصر الزنك فى العليقة . كما أن المستويات العليا لهرمون النمو يمكنها أيضا أن ترفع محصول اللبن . وبعيدا عن أهميتها الزراعية ، فإن هذه التكنولوجيا قد تكون أيضا مفيدة كنموذج لعلاج أمراض آدمية معينة ، مثل التعملق (gigantism) ، والذى ينشأ من الانتاج الزائد لهرمون النمو .

٦ ــ ٦ : إحتمالات المستقبل العلاج الجينى فى الانسان :

تنمو المعلومات الخاصة بإيلاج الجينات فى الحيوانات بسرعة فائقة ــ فهل يؤدى ذلك لامكانية إستعمال هذه التكنيكات فى علاج الأمراض الوراثية الآدمية فى المستقبل المنظور ؟ فكما ذكر فى الجزء ٦ ــ ١ أمكن عمل محاولات لإيلاج جينات فى الخلايا الجسدية العلاج الجينى للمرضى (Gene therapy) . ففى حالة العلاج الجينى للمرض كمحاولة العالم كلاين على مرضى الفاقة "تالاسيميا "الجزء ٦ ــ ٢) فهناك بعض المشاكل الأساسية التى يجب التغلب عليها . وهذه تشمل المشكلة الخاصة



الشكل ٦ ــ ٤ :

فأران من تجربــة هندسة وراثية .يحتوى الفار ناحية اليســار على جين هرمون النمو للجرذ الذى اندمج مع عنصر د ن أ "ميتاللوثيونين "الفار • الفار ناحية اليمـــــين يمثل نموذج المقارنــة •

بإدخال الجين الصحيح فى عدد كاف من خلايا الجسم لتحسين حالة المريض ، وكذلك إدخال الجين فى موضع محدد على الكروموسوم حيث يتم تنظيم مستوى تعبيره بطريقة عادية ، وكذلك إستعمال مُوجّه — أو أى طريقة أخرى — لإدخال الجين الذى لا يسبب تلفا للكروموسوم . وكل هذه المشاكل التكنيكية ذات أهمية قصوى فى الوقت الحاضر ، لكن يبدو من المحتمل جدا أنها سوف تُحَلّ خلال حوالى العقد أو العقدين القادمين من الزمن . والمجتمع الانسانى هو الذى عليه أن يحكم من الناحية الأخلاقية على هذا النوع من العلاج . ومن جهة نظر المؤلف ، فإن المشاكل الأخلاقية المرتبطة بهذا النوع من العلاج الجينى ، لا تختلف فى جوهرها من تلك المشاكل التى قد تنشأ من اكتشاف علاج دوائى جديد . وفى الأساس فإنها تشمل الحاجة للتأكد من أن أى علاج تجريبى لا يترتب عليه تعريض المريض لخطورة غير ضرورية، بالمقارنة بالمنفعة الطبية المحتملة ، كما أنه يجب الحصول على موافقة المريض المسبقة قبل إعطائه أى معاملة تجريبية .

لقد أصبحت فكرة العلاج الجينى للأجنة أكثر إشارة للجدل وللمناقشات الجادة الموسعة منذ أن طوّر أطباء أمراض النساء والتوليد تكنيكات الاخصاب فى الانبوب IVF للتغلب على بعض أنواع العقم فى النساء . وتشمل هذه التكنيكات إخصاب بيضة بحيوان منوى فى المختبر (المعمل) والاحتفاظ بالجنين لفترة قصيرة فى بيئة مستنبت قبل أن يزرع فى رحم الأم . لقد أدى إكتشاف تكنيكات الاخصاب فى الانبوب IVF إلى ولادة أول "طفل أنابيب" فى مدينة أولدهام Oldham " فى المملكة المتحدة عام ١٩٧٨ ، ثم تلى ذلك كثير من حالات الحمل الأخرى الناجحة فى جميع أنحاء العالم . ويبدو من الواضح أن هذه التكنيكات سوف تجد تطبيقات واسعة المدى فى المستقبل كعلاج للعقم . فهل من الممكن أيضا أنها تفتح الباب واسعا لادخال مادة وراثية جديدة للعلاج الجينى للأجنة ؟

قد تتسبب بعض الأمراض الوراثية عن طفرة فى جين واحد فقط ، والأمثلة على ذلك

من بين الكثير) تشمل أنيميا الخلايا المنجلية والتالاسيميا (الفاقة) وبول الفينيل كيتون ونقص هرمون النمو وتناذر ليش ـ نيمان Lesch-Nyman (انظر صفحة ١٢).

وتشير التقديرات فى بريطانيا إلى أن عيبا خطيرة فى جينات فردية تؤثر فى ١ % من الولادات . وبالرغم من ذلك ، فإن كثيرا من الأخطار الصحية ، على سبيل المثال مرض الشريان التاجى فى القلب ، وارتفاع ضغط الدم ، وبعض الأمراض النفسية وبعض أنواع السرطان لها أسباب معقدة قد تشمل التداخل بين جينات مختلفة وبعض العوامل البيئية الهامة . وهناك إتفاق عام على أن جهلنا بالأساس الوراثى للفئة الأخيرة من الأمراض كبير جدا لدرجة أنه لا توجد محاولات للعلاج الجينى لهذه الامراض ذات الجينات المتعددة يمكن توقعها فى المستقبل المنظور. وهنا يجب أن نذكر أيضا بأنه من غير المنطقى كلية أن نأخذ فى الاعتبار إمكانية تناول صفات معقدة وغير معروف خلفيتها بوضوح ، وربما قد يكون لها بعض المكونات الوراثية مثل السلوك والذكاء حتى لو كان بعض العلماء لديه رغبة ملحة فى تناول هذه الموضوعات التى تلاقى إعتراضات كثيرة من الناحية الأدبية والأخلاقية .

فهل يحتمل أن يجرى فى المستقبل العلاج الجينى لأمراض محكومة بوضوح بجينات فردية ؟ إن مشاكل إيلاج الجينات وتعبيرها عن نفسها مشابهة بدرجة كبيرة لما ذكر سابقا بالنسبة للمعالجة الجينية للمرضى ، وربما يمكن التغلب عليها فى خلال عقد من الزمان أو أكثر قليلا ، لكن هذا لا يعنى ضرورة إستعمال هذا العلاج ، حيث يوجد بدائل كثيرة يمكن للآباء إختيارها . فإذا فرض وجود حالة حيث كل من الأبوين خليط لنفس العيب الوراثى الخطير ، ومن ثم فإن الفرصة قدرها واحد فى كل أربعة أجنة لان يكون أحدها أصيلا لهذا المرض ويتأثر به . وهنا نفترض أنّ المعالجة الجينية يجب ألاّ يُلجأ إليها حتى تتأكد من أن الجنين فعلا أصيل للمرض ، وفى هذه الحالة قد يفضل معظم الآباء إجراء عملية إجهاض ثم استئناف الحمل مرة اخرى ، خير من الاقدام على العلاج الجينى غير المضمون .

وعلى مدى المستقبل البعيد ، قد تُحَلّ المشاكل التكنيكية لإيلاج وتعبير الجينات عن طريق توليفة ما بين تجارب العلاج الجينى فى الحيوانات والمعرفة المتزايدة لمضمون المادة الوراثية الآدمية . وهنا فقد يرغب الآباء فى تجربة العلاج الجينى دون إنهاء الحمل ، خاصة إذا كان العيب الوراثى من النوع الذى لا يهدد حياة الجنين ، ولكنه حالة قد تتطلب الرعاية الطبية التى يمكن تحملها حتى وإن كانت تؤثر قليلا على صفاته .
ويبدو أن النقطة المهمة فى الوقت الحاضر هى أنه يجب على المجتمع أن يضع فى الاعتبار الامكانيات المستقبلية لهذا النوع من العلاج وتبعاته التى قد تنشأ من الناحية الأدبية والأخلاقية ، قبل أن يكون ذلك قابلا للتطبيق من الناحية الفنية .

ويهيئ نجاح عمليات إخصاب البويضات الآدمية فى الأنبوب إمكانيات أخرى هائلة خلاف العلاج الجينى المحدود . وإحدى هذه الامكانيات هى محاولة استزراع الجنين فى الأنبوب عقب الاخصاب مباشرة لتقرير إحتمال كونه يحمل عيبا وراثيا . فعلى سبيل المثال ، لو أن أُمّاً قد وضعت فى الماضى طفلا لديه تناذر "داون" فقد تختار أن يحدث الاخصاب لانجاب طفلها التالى فى الأنبوب . فاذا حدث ذلك فيمكن أن يسمح للجنين بالنمو حتى طور خليتين أو أربع خلايا ، حيث يمكن أن تستعمل واحدة من الخلايا لتنمية مستعمرة (كلون) . وتنمى هذه المستعمرة فى مستنبت إلى أن تستعمل لاختبار ما إذا كان الجنين به شذوذ كروسومى مشخص لتناذر " داون " بواسطة التكنيكات السيتووراثية . وفى نفس الوقت فإن خلية أخرى أو أكثر من الجنين تخزن تحت التجميد . فإذا ثبت أن الجنين ليس به عيوب تناذر "داون" ، فانه لا يُجَمّد وينقل مباشرة إلى رحم الأم .

ويوجد إقتراح مثير للجدل وهو أن تكنيكات الاخصاب فى الانبوب والتجميد يمكن أن تستعمل بنفس الطريقة لانتخاب طفل بجنس معين على أساس هيئته الكروموسومية . ومن الواضح أن هناك تبعات أخلاقية وإجتماعية لذلك قد تحتاج لأن توخذ فى الاعتبار بواسطة المجتمع ككل .

الباب السابع

المعالجة الوراثية للخلايا النباتية

٧-١: تكتيكات مزارع الخلايا النباتية :

تستعمل تكتيكات تنمية مزارع الخلايا النباتية الآن على نطاق واسع بواسطة علماء النبات وعلماء الكيمياء الحيوية النباتية . ولوجود عديد من المراجع الخاصة بهذه التكتيكات - فسوف نتناولها هنا باختصار . ففى السنوات القليلة الماضية اتسع الاهتمام بدرجة كبيرة فى استعمال هذه المزارع الخلوية لتناول المواد الوراثية فى النباتات، ومن ثم سنتناول هنا بعض الاكتشافات الهامة فى مجال وراثة الخلية النباتية .

توجد عدة طرق لعمل مزارع الخلايا النباتية ، وأبسط هذه الطرق هى مزارع الكالاس "Callus" ،وهى عبارة عن نمو على شكل كتلة من عدة مئات أو عدة آلاف من خلايا غير متمايزة . ويمكن تنمية مزارع الكالاس من بادئات نباتية (explants) ناشئة من مدى واسع من الأنسجة . وتنمى هذه المزارع على سطح صلب من الآجار ، وقد يعاد تنميتها بنقل مقاطع إلى بيئة طازجة . ويتم ضبط مستويات هرمونات النمو النباتية فى البيئة للحصول إلى أعلى معدل للانقسام الخلوى .

وفى التجارب الوراثية يكون من المفيد أن تنمى الخلايا النباتية على شكل معلقات من خلايا فردية كثيرة العدد . وتنشأ هذه المزارع من معلقات الخلايا عادة بنقل مزارع كالاس فى بيئة سائلة ثم تفصل الخلايا عن بعضها بواسطة الأجهزة الهزازة . ويفضل فصل الخلايا من الأنسجة بوضع درجة تركيز الأوكسين أو بإضافة تركيزات منخفضة من إنزيمات تجريد جدر الخلايا مثل إنزيم السليوليز . وبالرغم من ذلك،توجد

عادة تجمعات خلوية مع الخلايا الفردية (الشكل ٧ـ١) . كما طورت أيضا تكنيكات لانتاج مستعمرات من خلايا فردية (أو من تجمعات خلوية) على سطح من الآجار .

إن إستعمال مزارع الخلايا النباتية فى الدراسات الوراثية له ميزة ملحوظة عن إستعمال مزارع الخلايا الحيوانية . ففى كثير من الحالات يمكن تنمية نباتات كاملة من خلايا فردية نامية فى مستنبتات ـ حيث تسمى الخلايا " وحدة الامكانيات "totipotent" " وتفتح هذه الدراسات المجال واسعا لفرص هامة لاجراء المعالجات الوراثية على الخلايا فى المستنبتات ثم بعد ذلك تنميتها لطرز جديدة من النباتات للدراسات العلمية أو للاستعمال الزراعى . ويجب أن نوخذ هذه القاعدة العامة فى الوقت الحاضر بشىء من التحفظ ، حيث أن بعض نباتات المحاصيل الهامة (على سبيل المثال عديد من النجيليات) قد ثبت أنه يصعب تنميتها من مستنبتات خلايا فردية .

وهناك ميزة أخرى مفيدة لمزارع الخلايا النباتية ـ لا تتوفر فى مزارع الخلايا الحيوانية ، وهى أن مزارع من خلايا أحادية المجموعة الكروموسومية يمكن عملها من المتوك (anthers) وهذا مهم جدا لأنها توفر الامكانية لعزل ودراسة الطفرات المتنحية بدون تعقيدات الأليلات السائدة التى تخفى الأليلات المتنحية الطافرة. فإذا أمكن وقف إنقسام خلايا المستنبت الأحادى (بالتعريض لمادة الكولشيسين لفترة قصيرة) فقد تفشل الكروموسومات فى الانفصال أثناء الانقسام الميتوزى وتصبح المزرعة ثنائية . وهذه عادة ما تصبح أصيلة لكل الجينات ، ومن ثم فان تجديد نباتات كاملة من مثل مزارع الخلايا هذه ، يمكن أن يوفر لنا طريقة أسرع كثيرا للحصول على نباتات أصيلة تماما ، بدلا من دورات التلقيحات الرجعية المتكررة والتى هى ضرورية فى علم تربية النبات التقليدى .

٧ـ٢ : التباين الوراثى فى النباتات المتجددة من خلايا :

إذا أسس مستنبت خلوى من نبات ثم جددت نباتات كاملة من هذا المستنبت الخلوى



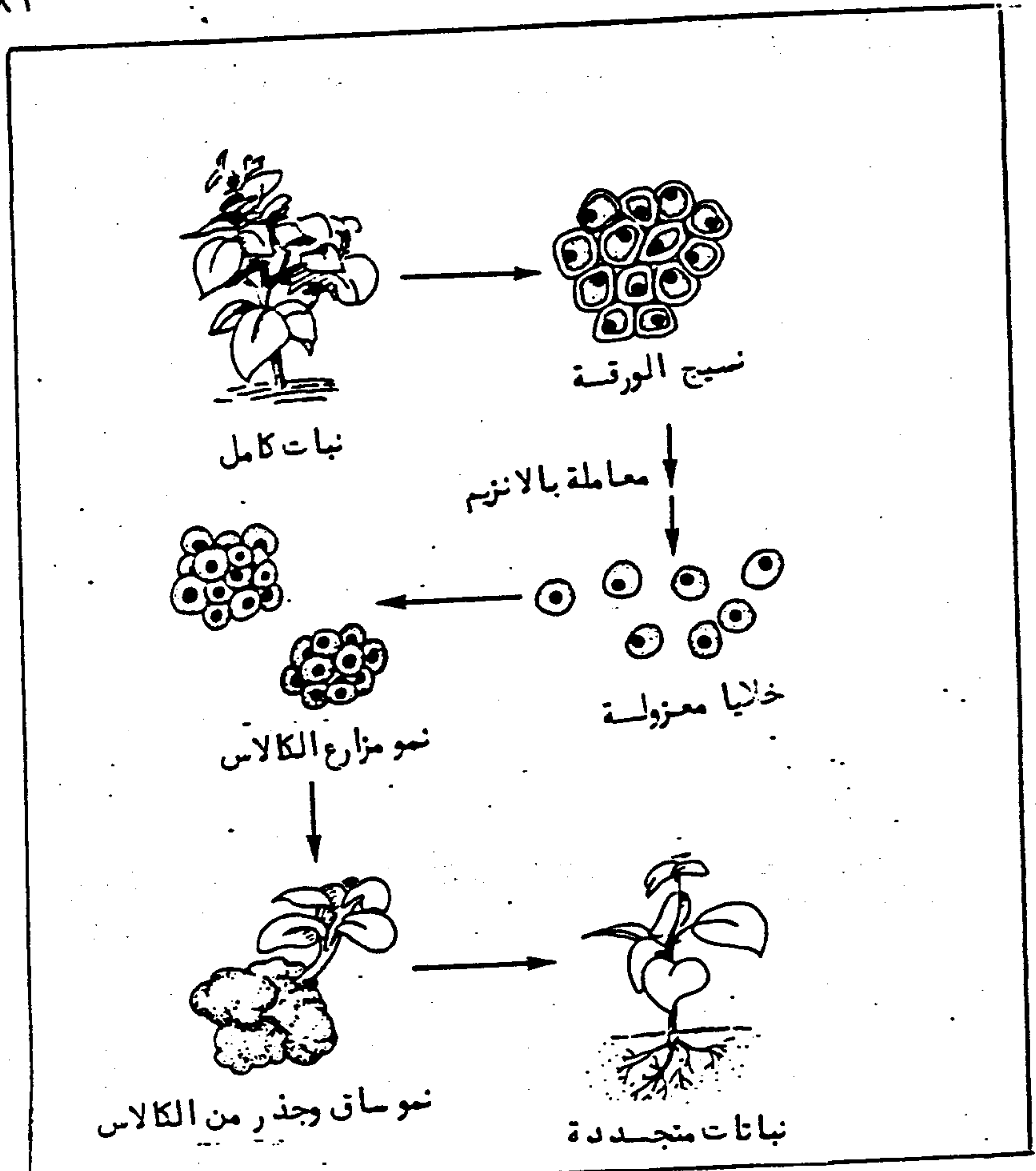
الشكل ٧ ـ ١ :

معلق من مستنبت خلايا من نبات الكاثارانثس Catharanthus roseus .

فكثيرا ما يشاهد نسبة عالية جدا من التباين المظهرى فى النباتات الناتجة النامية (الشكل ٧ ــ ٢) • وتسمى هذه الظاهرة "تباين الكلونات الجسدية "

(Somaclonal variation) • وكمثال لهذه الظاهرة ــ ففى إحدى التجارب وُجد أنّ ٧٢ ٪ من نباتات الأُرز المتجددة فى مستنبتات من كالا من نبات الأُرز قد أظهرت إختلافات جوهرية عن نباتات المقارنة ــ بالنسبة لصفات إرتفاع النبات والشكل العام والكلوروفيل والخصوبة • والأساس الوراثى لهذا المستوى العالى جدا من التباين فى مزارع الخلايا غير واضح كلية • فلربما يكون جزئيا نتيجة للطفرات التقليدية (أى التغيرات فى تتابعات الدن أ التى يتكون منها الجين) • لكن معدل هذا التباين عالى جدا عن المألوف للطفرات التلقائية ــ مما يترك المجال لتفسيرات أُخَر • وأحد التفسيرات المحتملة هو حدوث تغيرات دقيقة كثيرة فى مناطق كروموسومية (غالبا لا يمكن إدراكها ميكروسكوبيا) أثناء عمل المزارع الخلوية ــ وهذه قد تؤدى إلى تغيرات فى تعبير الجينات • ويحتاج هذا الاقتراح أبحاثا آخر قبل إمكانية قبوله بشىء من الثقة •

وبالرغم من أنّ الميكانيكيات المُحدِّدة لتباين الكلونات الجسدية غير مفهومة تماما ؛ إلا أنها قد تكون مفيدة فى تنشئة أصناف زراعية ذات فائدة • وفى عام ١٩٨٢ درس العالم شيبارد SHEPARD هذه الظاهرة فى صنف من البطاطس يسمى "روسيت باربانك " وهو أكثر أصناف البطاطس إنتشارا فى الزراعة فى الولايات المتحدة ؛ ويمثل حوالى ٤٠ ٪ من الانتاج الكلى • ولقد أدرك "شيبارد " الملاحظة الهامة والتى هى أنّ النباتات المتجددة من مزارع الكالاس لهذا الصنف من البطاطس تختلف إختلافا كبيرا فى مقاومتها للفطر <u>Phytophthora</u> <u>infestans</u> المسبب لعفن البطاطس والذى تسبب عنه مجاعة البطاطس الأيرلندية فى حقبة الأربعينات من القرن التاسع عشر • والذى ما زال يشكّل المشكلة الرئيسية فى زراعة البطاطس على النطاق التجارى • وكانت بعض نباتات البطاطس المتجددة ذات مقاومة أكثر للفطر عن نباتات المقارنة من الصنف "روسيت باربانك " • وفى نباتات بنجر السكر



الشكل ٧ ـ ٢ :

إنطــلاق تباين الكونات الجســدية، تعزل أنســجة الورقة من نبات ناضج. نتحصل علــى خلايا فردية عقب المعاملة الانزيميــة للنسيج ثم تزرع الخلايا لتعطى مزارع كالاس كثيرة، بعد فــترة من الزمن فى بيئة الكالاس المناســبة وتعطى مزارع الكالاس ساقا خضريا وربمــــا تزرع فى التربــة • بعد ذلك يمكن أن تختــبر هذه النباتات لتباين الكلونات الجسدية •

التى تجددت من مزارع الخلايا ، أمكن إيجاد سلالات بها مقاومة متزايدة للأمراض الهامة (مثل مرض البياض الزغبى ومرض التبقع (eyespot) وكذلك محتوى متزايد من السكروز .

٧ـ٣ : الانتخاب المباشر للطوافر فى المستنبتات :

يمكن إجراء الانتخاب مباشرة لطوافر معينة على الخلايا النباتية النامية فى المستنبت، بنفس الطريقة كما فى الخلايا الحيوانية (الجزء ٢ ـ ١) وكما فى الكائنات الدقيقة . ولأن الانتخاب فى مزارع الخلايا قد يُجْرَى على عدد هائل من الخلايا (ربما عشرات الملايين) ، فهناك فرصة أفضل لعزل متباينات نادرة أكثر من التى قد تتواجد لو أن الانتخاب قد أُجرى على عدة مئات أو آلاف من النباتات الكاملة . ولو أمكن عزل طافر من مستنبت خلوى ، عندئذ يمكن إستعماله فى تجديد نبات كامل ، وقد يؤدى ذلك إلى إنتاج صنف جديد بخصائص زراعية مفيدة .

ويجب ان ينحصر الانتخاب للطوافر فى مزارع الخلايا على الصفات المظهرية التى يُعَبَّر عنها فى هذا الطور . وهذا يحدد الصفات التى نتعامل معها بتلك الموجودة على مستوى الخلية وليس الموجودة على مستوى الكائن كلية . فعلى سبيل المثال ، لو كان الهدف الحصول على صنف مقاوم للجفاف من محصول ما ، فإنه من الواضح أنه يستحيل أن تنتخب طافرا بجذور أطول باستعمال تكنيكات مزارع الخلايا ، لكن قد يكون من الممكن أن تنتخب خلايا بتنظيم أسموزى متغير ، والتى قد تنتج نباتات متجددة ذات تحمل متغير للجفاف .

لقد تم إنتخاب طوافر مقاومة كثيرة فى مزارع الخلايا النباتية . ولقد تمكن الباحث ر . س كاليف (R.S. Chaleff) من إنتخاب خلية نبات طباق مقاومة لمبيد الحشائش "بكلرام" بواسطة زرع خلايا فى وجود مبيد الحشائش هذا . ولقد

أثبتت الدراسة أن النباتات المتجددة من هذه الخلايا كانت عالية المقاومة نتيجة لتأثير جينات سائدة أو شبه سائدة • وتسمح المقاومة المتزايدة لمبيدات الحشائش في المحاصيل النباتية بتمييز أكثر فعالية بين نبات المحصول والحشائش أثناء المعاملة •

وقد تُحدّد القيمة الغذائية للبروتينات النباتية بواسطة المستويات المنخفضة لأحماض أمينية معينة ، ومن ثم فقد يُوجّه الاهتمام ناحية الطرق الممكنة لتصحيح ذلك. وأحد الطرق لتصحيح ذلك هو البحث عن مزارع خلوية طافرة تكون مقاومة لمشابهات هذه الأحماض الأمينية • وهذه المشابهات عادة ما تكون سامة لأنها تندمج في البروتينات وتجعلها غير فعالة • كما أن الخلايا النباتية قد تكتسب مناعة ضد حمض أميني مشابه بواسطة الانتاج الزائد للحمض الأميني العادي،مما يجعله يحمي التأثيرات الضارة للحمض المشابه ، ويقلل اندماجه في البروتين • ومن ثم فإن إنتخاب طوافر مقاومة للأحماض المشابهة يوفر سبيلا للحصول على طوافر ذات مستوى عالٍ من أحماض أمينية معينة • وعلى سبيل المثال فإن المزارع الخلوية الطافرة التي تُنتخب على أساس المقاومة لمشابه الحمض الأميني "هيدروكسيل ليسين" تنتج الحمض الأميني ليسين العادي بكثافة عالية • وبالرغم من أن ذلك الاكتشاف يدعو للأمل ، إلا أننا يجب أن نتذكر أن زيادة المستويات للأحماض الأمينية الناقصة في مستودع الأحماض الأمينية الحرة ، هي فقط الخطوة الأولى نحو تغيير الأحماض الأمينية للبروتينات المختزنة في البذور والتي تستعمل كطعام بواسطة الآدميين • وبالاضافة للعمل على زيادة مستويات الأحماض الأمينية الحرة ، فقد يكون من الضروري أن نغيّر في الجينات المسيطرة شفريا على هذه البروتينات المختزنة بواسطة طرق أخرى للمعالجة الوراثية ، مما يترتب عليه أنها تكون حاوية لنسب أعلى من الشفرات الخاصة بالأحماض الأمينية المطلوبة •

٧ـ ٤ : إندماج البروتوبلاستات :

إن أحد الخصائص الهامة لوراثة الخلايا الحيوانية في المستنبتات هي أنها

يمكنها أن تندمج لتكوّن توافيق جديدة من المادة الوراثية (أنظر الباب الثانى) . فهل يمكن للخلايا النباتية أن تندمج بطريقة مشابهة ؟ إن الاجابة المباشرة على هذا التساؤل هى عدم إمكان حدوث ذلك بسبب الجُدُر المحكمة التى تحيط بهذه الخلايا . لكن العالم إ . س كوكنج E.C. cocking وغيره قد بينوا أنّ البروتوبلاستات التى تنتج بعد إزالة جُدُر الخلايا يمكنها أن تندمج ولها قدرات هائلة للدراسات الوراثية .

وحاليا يمكن أن تعزل البروتوبلاستات من أنواع نباتية كثيرة كذلك من أنسجة كثيرة (على سبيل المثال الأوراق والجذور والاغماد الخلوية الأمية لحبوب اللقاح ومزارع الكالاس). ويتم إزالة جُدُر الخلايا بواسطة إنزيمات مختلفة (السليوليز والهيميسليوليز والبكتينيز). ثم بعد ذلك تُستبقى البروتوبلاستات باستمرار فى بيئة نمو تكون فيها الخصائص الأسموزية تحت السيطرة التنظيمية التامة . كما أنه يمكن زيادة معدل الاندماجات البروتوبلاستية بمعاملات مختلفة كالتعريض لنترات الصوديوم أو مادة البولى إيثيلين جلايكول .

ويمكن للبروتوبلاستات المأخوذة من انواع نباتية مختلفة أن تندمج مع بعضها . فاذا كانت البروتوبلاستات المندمجة من أنواع ذات قرابة شديدة ، فإن الهيئات الكروموسومية للنباتات المتجددة الناتجة قد يكون بها إختلافات طفيفة عن مجمل الهيئتين الكروموسوميتين الأصليتين.فعلى سبيل المثال ، النباتات المتجددة من الاندماج بين بروتوبلاستات نبات "البيتونيا هيبريدا " Petunia hybrida " وبروتوبلاستات نبات "البيتونيا باروديای " Petunia parodii " تحتوى على هيئات كروموسومية تتراوح ما بين ٢٤ ــ ٢٨ كروموسوما ، بالرغم من أنّ مجمل الهيئتين الاصليتين هو ٢٨ كروموسوما . وبالرغم من ذلك لو كانت البروتوبلاستات المندمجة من أنواع ضعيفة القرابة ، فغالبا ما يلاحظ أن الكروموسومات من أحدهما تُستَبْعد أثناء النمو فى مزارع الكالاس . وقد تكون النباتات المتجددة من الكالاس حاوية لكروموسومات من نوع واحد فقط ، عند فحصها مجهريا . وبالرغم من ذلك ففى بعض الحالات قد ثبت بالدليل القاطع وجود كميات ضئيلة من المادة الوراثية للنوع الآخر ، بغض النظر عن غياب كروموسوماته

عند الفحص المجهري . فعلى سبيل المثال ، أجرى العالم د. دونيتس (D. Donitis)
تهجينا لبروتوبلاستات من نبات الجزر ((Daucus carota)) مع بروتوبلاستات
من نبات ((Aegopodium podagraria)) فكانت النباتات الهجينة الناتجة
تحتوي فقط على كروموسومات الجزر ، لكن التحليلات البيوجزيئية التي تميز أنواعا معينة
من تتابعات الأحماض النووية ، قد أظهرت وجود بعض المادة الوراثية من نباتات
الـ Aegopodium . ولقد فسر العالم دونيتس نتائجه التي تمت عقب الاندماج
فإن الكروموسومات الآتية من نبات الـ Aegopodium قد تكون قد تكسرت
إلى شظايا صغيرة واندمجت في كروموسومات الجزر - بطريقة مشابهة تماما لاندماج
شظايا كروموسومية في كروموسومات خلايا الثدييات التي سبق مناقشتها في الباب الثالث .
وتتطلب هذه النتائج دراسة أكثر ، لكنه يقترح سبيلا ممكنا لزيادة الجينات المفيدة
من نوع ما في كروموسومات نوع آخر .

٧ـ٥ :: دمج جينات جديدة في النباتات ::

هل من الممكن أن ندخل د ن ا غريبة في خلايا نباتية مباشرة أو من خلال بعض
من أنواع الموجهات ؟ لقد ظهرت عدة تقارير عن إدخال الـ د ن ا الحر في خلايا
نباتية ، مما أدى إلى حدوث تغير في الشكل المظهري للنبات ، لكن كانت هذه
النتائج غير قابلة للتكرار من جديد ، كما أن الظاهرة ما زالت تحتاج إلى تفسير واضح .
وفي السنوات القليلة الماضية ، ركز علماء البيولوجيا الجزيئية جهودهم في استعمال
موجهات لحمل الجينات الغريبة إلى داخل الخلايا النباتية .

إن أكثر الموجهات أهمية هو البلازميد " Ti " المستحث للسرطان tumor
inducing ((ارجع إلى الجزء ٥ـ١)) ، وهو بلازميد كبير محمول بواسطة بعض
السلالات من بكتريا الأجروباكتريم تيموفاسنز Agrobacterium tumifaciens
فعندما تعدي هذه البكتريات النباتات ، فإن كتلة من نمو غير متمايز - تسمى التدرن
التاجي الحوصلي - تتكون عند منطقة الاتصال ما بين الجذر والساق ((المعروفة نباتيا

باسم التاج) . ويتطلب الأمر تقديم عرض مختصر للبيولوجيا الجزيئية المميزة للعدوى قبل الأخذ فى الاعتبار إستعمال بلازميدات Ti كموجهات (الشكل ٧ ــ ٣) .
فتجعل العدوى البكتيرية خلال النبات تبدأ فى إنتاج واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية غير العادية (لا تنتج عادة بواسطة خلايا النبات) والتى تسمى الأوبينات Opines .
وأكثر هذه الأوبينات انتشارا يسمى "الأوبالين Opaline والنوبالين nopaline .
وتستعمل الأوبينات كمصدر أساسى مُطلَق للنيتروجين فى البكتريم ، ويترتب على ذلك أن البكتريم يُوجِّه بكفاءة عالية جزءا كبيرا من أيض النبات لاستعماله الخاص ــ فكيف يتم ذلك ؟

يمكن لذلك أن يتم فقط لو أن البكتريات المعدية احتوت على البلازميد Ti .
وباستعمال تكنيكات البيولوجيا الجزيئية ، فقد بين شلتون Shelto (١٩٨٣) وغيره من الباحثين أن جزءا من د ن ا البلازميد يصبح مندمجا فى كروموسومات النبات أثناء استهلال تكوين التدرن التاجى الحوصلى . ويكون البكتريم فى وضع يسمح له بأن يعمل بنفسه هندسته الوراثية فى النبات ، بواسطة إدخال جينات جديدة فى كروموسومات النبات والتى تسبب إنتاج الأوبينات وتكاثر الخلايا المنتجة لهذه "الاوبينات"

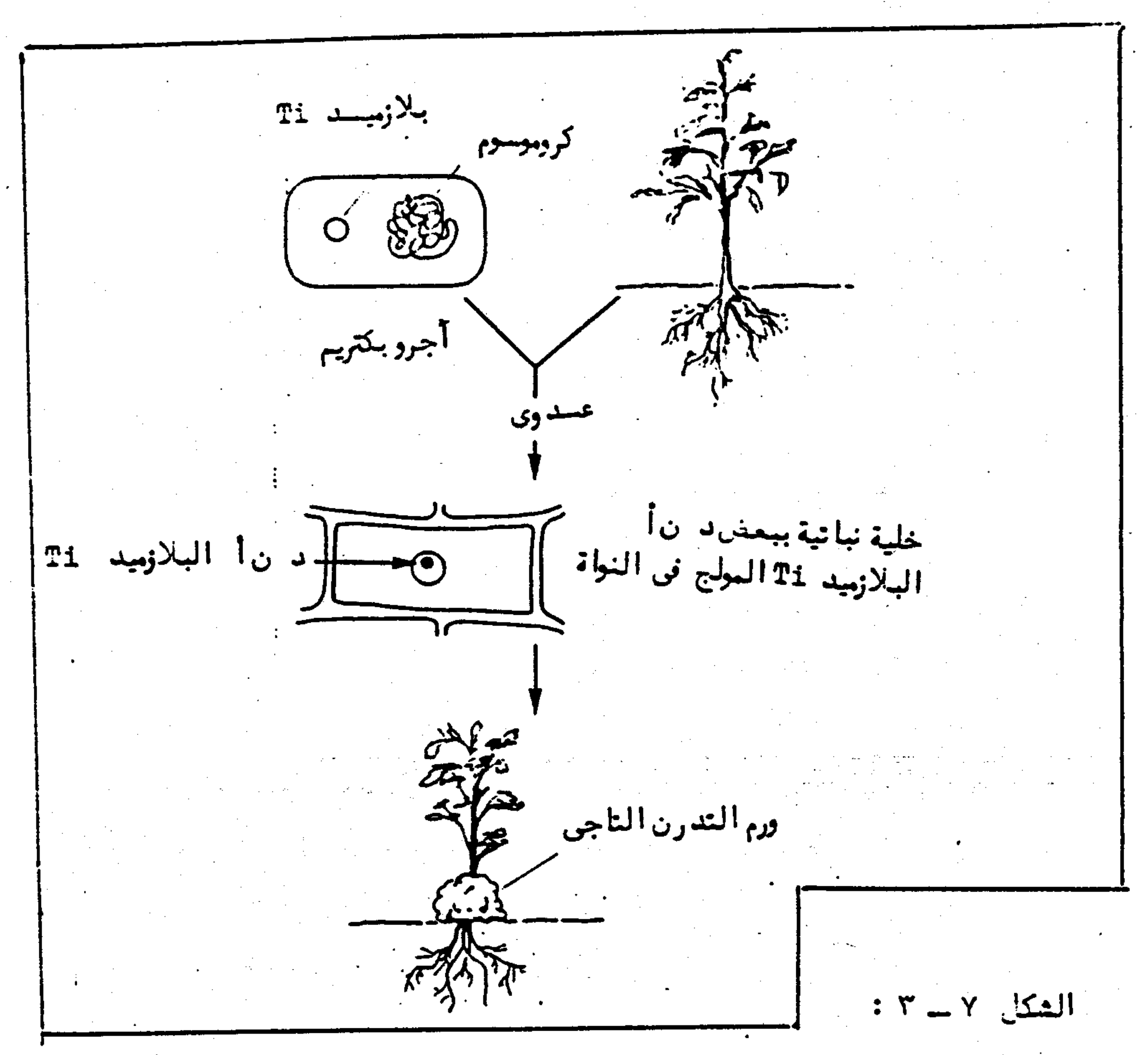
ومن الواضح أن هذه الظاهرة لها إمكانيات كبيرة لاجراء الهندسة الوراثية العملية. يمكن استعمال تكنيكات الد ن ا المطعم لإيلاج مقاطع إضافية من المادة الوراثية فى د ن أ البلازميد ، ثم بعد ذلك يمكن أن تندمج فى كروموسومات النبات مع شدفة من د ن أ البلازميد Ti أثناء استهلال تكوين تورم التاج : ويصعب على خلايا التاج المتورم أن تتجدد إلى نباتات كاملة ، وإن كان ذلك قد أمكن تحقيقه الآن باستعمال مستويات مناسبة من السيتوكينين. ومما سبق يلاحظ أنه من الممكن أن يستعمل البلازميد لادخال د ن أ غريب إلى خلايا النبات .

وكما فى تجارب الخلايا الحيوانية (الباب ٥ ، ٦) فانه من الضرورى أن نتأكد أن الجينات المولجة تُعبِّر عن نفسها (أى تُنسَخ إلى ر ن ا حامل الرسالة ثم تترجم إلى

بروتين) . وهذا لا يحدث عادة مع الجينات المُولَجة عشوائيا ، لكن أمكن منذ وقت قريب بيان أنه في بعض التجارب إذا حُرِّك جين موجود بواسطة بعض الطرق البيوكيميائية من د ن أ البلازميد ، وأن جينا غريبا قد أُولج في نفس المكان تماما ، فإن الجين الجديد يُعبِّر عن نفسه في خلايا التورم الحوصلية ، وذلك لأن القواعد المجاورة والتي هي ضرورية لتنظيم النشاط الوراثي مازالت متواجدة وأنها تقوم بالتنظيم للجين المولَج بنفس الطريقة كما كانت في حالة الجين الأصلي .

وأيضا تعتبر بعض الفيروسات النباتية كموجِّهات لادخال مواد وراثية جديدة في خلايا النبات . ولقد تمت دراسة فيروسات تبقع القنبيط (القرنبيط) بالمعافضة كاملة وذلك لأن مادتها الوراثية تتكون من د ن أ مزدوج الخيط (على النقيض من كثير من الفيروسات النباتية) ، وهذا يجعلها مناسبة للمعالجة بواسطة تكنيكات الد ن ا المطعم . والاستراتيجية المقترحة للهندسة الوراثية هي أن تُعدَى النباتات الكاملة بالفيروس الحامل لد ن أ غريب . ثم بعد ذلك ينتشر الفيروس (الكوليمفيروس) خلال كل النبات . وبالرغم من أن الفيروس لا ينتقل خلال البذور ، إلا أنه ينتشر أثناء التكاثر الخضري .

إن استعمال د ن أ الفيروس النباتي كموجِّه يخلق مشكلة لا تتواجد مع البلازميد Ti. فيكون د ن أ الفيروس محصورا في غلاف بروتيني ، ويضع ذلك حداً للكمية للد ن ا التي تدخل الجسيمات الفيروسية . فاذا أضيف د ن أ جديد بواسطة المعالجة المعملية ، فإن بعضا من الد ن ا المتواجد (داخل غلاف الفيروس) يجب أن يستبعد حتى يسمح بيقاء د ن أ (مطعم) في نطاق الحجم الذي يسمح به الغلاف البروتيني للفيروس ، كما أن استبعاد بعض الجينات ربما يؤثر بالسلب في الوظائف الفيروسية . بهذه المشكلة ، من بين غيرها من المشاكل ، تشير إلى أنه بالرغم من أن الكوليمفيروسات مازالت تعتبر كموجهات للامكانيات الجينية في النباتات ، إلا أن الأمر يتطلب دراسات أكثر استفاضة من زاوية البيولوجيا الجزيئية الخاصة بها .



الشكل ٧ ـ ٣ :

التورم الحوصلى التاجى الذى يعقب العـدوى بالأجرو باكتريم Agrobacterium tumifaciens يصبح جزء من د ن أ البلازميد Ti بثبات فى كروموسومات الخلايا النباتية ، مما يؤدى الى تخليق أوبين وانقسام الخلايا .

فاذا أمكن تطوير موجبات مناسبة ، فما هى الجينات التى قد يراد إيلاجها فى المحاصيل النباتية ؟ إنّ كثيراً من الصفات الهامة فى نباتات المحاصيل لا تحدّد بجينات مندلية فردية ، لكنها تظهر نتيجة التداخل بين عشرات أو مئات من الجينات . فعلى سبيل المثال ، المواءمة للجفاف ، أو للحرارة العالية (نتيجة التناقص فى سطح الورقة ، أو تكوّن فتحات ثغرية أقل) تقع تحت سيطرة نظام وراثى معقد غير مفهوم حتى الآن . كما أن ذلك الاقتراح الجذاب وهو محاولة إدخال الجينات المسئولة عن تثبيت النيتروجين الجوى فى نباتات المحاصيل ما زال يكتنفه بعض الصعوبات فيوجد سبعة عشر جينا لتثبيت النيتروجين فى الكلبسيللا (Klebsiella pneumonia) وهذه تقع تحت سيطرة نظام معقد . كما أنّ إيلاج جينات الكائنات بدائيات النوى فى خلايا مميزة النوى سوف يؤدى إلى سيطرة منقوصة فى نشاط الجين . كما أن الخصائص الأُخَر لعملية التمثيل فى الخلايا النباتية قد تُحوّر من أجل تثبيت النيتروجين بطريقة فعالة . فمثلا إنزيم النيتروجينيز ، والذى يلعب دورا رئيسيا فى تثبيت النيتروجين – يعتمد بدرجة عالية جدا على الاكسجين ، ومن ثم فإن مستوى الاكسجين فى الخلية يجب أن ينظّم بطريقة محكمة .

وتبدو الآمال المعقودة على إدخال تعديلات على الصفات البسيطة (المحكومة بعدد محدود من الجينات) فى النباتات أكثر إشراقا . فعادة تقع صفة المقاومة لمبيدات الحشائش تحت سيطرة جين واحد فقط ، ومن ثم فهى مهيأة – فى المستقبل لأن تدخل فى مجال تجارب الهندسة الوراثية . كما أن إيلاج الجينات المسيطرة شفريا على تحوير البروتينات المختزنة فى البذور – من ناحية تحسين مكوناتها من الأحماض الأمينية – تمثل هدفا يسعى كثير من العلماء إلى تحقيقه ، بالرغم من أنّ هناك بعض المشاكل التى قد تبرز هنا وذلك لأن البروتينات المخزنة فى البذور تمثل ترافيق من البروتينات المختلفة عن بعضها بدرجة بسيطة والمسيطر عليها شفريا بعائلة من الجينات ذات القرابة فى كل نبات . ومن ثم ، فإن عددا من الجينات يجب أن يستبدل قبل أن يحدث أى تغيير جوهرى فى القيمة الغذائية الكلية لبروتينات البذور .

خاتمـــــــــة

xxxxxxxxxxxxxxxx

إنّ الهدف من هذا الجزء هو أن نعطى فكرة عامة عن البحـوث الجارية فى هـذا المجال.كما أن الصورة العامة قد تبدو "قاتمة" . وبالرغم من ذلك يجب أن تخضـع المشاكل الجارية قيد البحث المكثف . كما أن الأبحاث ذات الفعالية تجرى باسـتخدام بعض الموجهـات للجينات النباتية منذ حوالـى عشر سـنوات،وبالرغم من أن هناك مشاكل جوهرية تواجه مهندسى الوراثـة النباتية ، فإن معظم هذه المشـاكل قد يمكن التغلب عليهـا خلال العقدين القادمـين . وعندما ننظر إلى ذلك على مسـتوى الزمـــن ، فإن الهندسة الوراثيـة للنباتات تبدو ـ بالتأكيد ـ أنها سوف تؤدى إلى زيادات جوهريـة فـى إنتاج الطعام على المستوى العالمـى .

x x x x

الفهـرس

- أجرو بكتريا — Agrobacterium tumifaciens
  (البكتريا الزراعية المسببة للتورم التاجى)
- أمينو بترين — Aminopterin
  (عقار طبى يضاف لتثبيط بعض المسارات الكيميائية فى الخلية)
- بذل سلى — Ammiocentesis
  (سحب السائل السلى من الجنين للفحص الطبى)
- ورم بريتونى إستسقائى — Ascites tumour
- فطر الأسبرجلس نيديولانز — Aspergillus nidulans
- أوكسينات (هرمونات نباتية) — Auxins
- أزاجوانين (نظير القاعدة البيورينية جوانين) — Azaguanine
- فيروس القنبيط (المسبب للورم التاجى) — Caulimovirus
- مسرطنات (مواد مسببة للسرطان) — Carcinogenesis
- إندماج خلوى — Cell fusion
- إنزيمات تجريد المواد السليولوزية — Cellulases
- الكلاميديا — Chlamydia trachomatis
  (طفيل بين خلوى يسبب مرض الزهرى)

Chromosome rearrangement	— إعادة تنظيم الكروموسوم (تنظيم هندسى جديد للكروموسوم)
Chromosome uptake	— إلتقاط (شفط) الكروموسوم
Conjugation	— تزاوج إقترانى (فى البكتريات)
Coronary heart disease	— مرض الشريان التاجى
Coronavirus	— ڤيروس كورونا (مسبب لحساسية غير عادية فى التنفس)
Co-transformation	— تحوّل مشترك (لأكثر من جين)
Crown gall tumour	— مرض التدرن التاجى (فى النباتات)
Dimethylsulphoxide	— ثنائى ميثيل السلفوكسيد
DNA hybridization	— تهجين الدنا
DNA replication	— تناسخ الدنا
Downey mildew	— مرض البياض الزغبى (فى النباتات)
Down's Syndrome	— تناذر داون (مرض وراثى آدمى نتيجة شذوذ كروموسومى)
Eco Rl	— إنزيم قطع مشتق من بكتريا المعى
Escherichia coli	— بكتريا المعى (القولون)

Established cell cultures	– مزارع خلوية راسخة
Gene cloning	– استزراع الجينات
Gene expression	– تعبير الجينات
Gene therapy	– علاج جيني
Genetic counselling	– استشارة وراثية
Gigantism	– تعزم
Globin genes	– جينات الجلوبين
Glycosylation	– جلكنة (إضافة مجموعة جلاكول)
HAT selection	– إنتخاب على بيئة هات
Helper virus	– ڤيروس ساعد
Heterokaryon	– خليط النوى (فى الفطريات)
Human genetic map	– خريطة وراثية آدمية
Hybridomas	– هريبريدومات (هجن خلوية حيوانية)
In vitro fertilization (IFV)	– إخصاب فى الأنبوب
Interferon	– إنترفيرون (بروتين مناعة آدمى)

Klebsiella pneumonia	– بكتريا الكليسيللا (مثبتة للنيتروجين).
Lysch-Nyhan Syndrome	– تناذر ليش- نيهان (مرض وراثى آدمى لشذوذ كروموسومى)
Leukaemia	– اللوكيميا (سرطان الدم)
Ligase	– ليجيز (إنزيم لحام د ن أ)
Lytic cycle	– دورة تحللية (فى البكتريات)
Medical Ethics panel	– مجلس الاعراف الطبية
Metallothionein	– ميتاللوثيونين (بروتين يرتبط بالمعادن الثقيلة)
Methotrexate	– ميثوتريكسات (عقار طبى ضاد للسرطان)
Microinjection	– حقن دقيق
Monoclonal antibodies	– أجسام ضادة وحيدة الكلون
Myelome	– ميلوما (خلايا سرطانية)
Neisseria gonorrhoeae	– ميكروب مرض السيلان (جنسى)
Opines	– أوبينات (نوع من الأحماض الأمينية غير العادية تنتجها الخلايا النباتية عند الاصابة بالبكتريا)
Parasexual cycle	– دورة بديلة الجنس
pBR 322	– بلازميد بكتيرى

Petunia sp.	– بيتونيا (نوع نباتى)
Phenylketonuria	– مرض بول الفينيل كيتون
Phytophthora infestans	– فطر عفن البطاطس
Plasmids	– بلازميدات (مقاطع د ن أ سيتوبلازمية)
Polyethylene glycol	– بولى إثيلين الجلايكول
Primary cell cultures	– مزارع خلوية أولية
Protoplasts	– بروتوبلاستات (خلايا نباتية بدون جُدُر)
Rabies	– ڤيروس رابى (مسبب لمرض الكلب)
Recombinant DNA	– د ن أ مطعم
Reimplantation	– إستزراع جديد
Restriction endonucleases	– إنزيمات القطع البينية
Sandai virus	– ڤيروس سانداى (أحد ڤيروسات الانفلونزا)
Somaclonal variation	– تباين الكلونات الجسدية
Syntenic genes	– جينات متلازمة
SV40	– إختصار ڤيروس سانداى
Synthetic vectors	– مُوجّهات مُخلّقة صناعيا

Teratocarcinomas	- خلايا سرطانية خاصة
Thalassaemia	- ثالاسيميا (فاقة البحر الابيض)
Thymidine kinase	- إنزيم الثيميدين كينيز
Totipotency	- إمكانية وراثية كامنة
Transduction	- إستنقال (نقل وراثى بالفاج)
Transformation	- تحوّل (وراثى)
Vectors	- موجهات

مراجع لمزيد من القراءات فى مجال

الهندسة الوراثية

Further Reading

ANDERSON, W.F. and DIACUMAKOS, E.G. (1981). Genetic engineering in mammalian cells. *Scientific American*, 245 (pt. 1), 60–93.

BERG, P. (1981). Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science*, 213, 296–302. (A discussion of new vectors for cloning genes in mammalian cells.)

BUTCHER, D.N. and INGRAM, D.S. (1976). *Plant Tissue Culture*. Studies in Biology, No. 65. Edward Arnold, London.

CHILTON, M. (1983). A vector for introducing new genes into plants. *Scientific American*, 248 (pt. 6), 36–45.

DAY, M.J. (1982). *Plasmids*. Studies in Biology, no. 142. Edward Arnold, London.

KLOBUTCHER, C.A. and RUDDLE, F.H. (1981). Chromosome mediated gene transfer. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 533–55.

LEWIN, B.L. (1980). *Gene Expression. Volume 2, Eucaryotic Chromosomes*, 2nd edition. John Wiley and Sons, New York. (Chapters 6, 8 and 9 discuss the genetics of mammalian cell cultures.)

MOTULSKY, A.G. (1983). Impact of genetic manipulation on society and medicine. *Science*, 219, 135–40.

OLD, R.W. and PRIMROSE, S.B. (1981). *Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering*. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. (Chapters 9 and 10 discuss cloning in higher organisms. Other chapters give background information on gene cloning in bacteria.)

RIGBY, P.W.J. (1982). Expression of cloned genes in eukaryotic cells using vector systems derived from viral replicons. In *Genetic Engineering*, 3. (WILLIAMSON, R., ed.). Academic Press, London and New York.

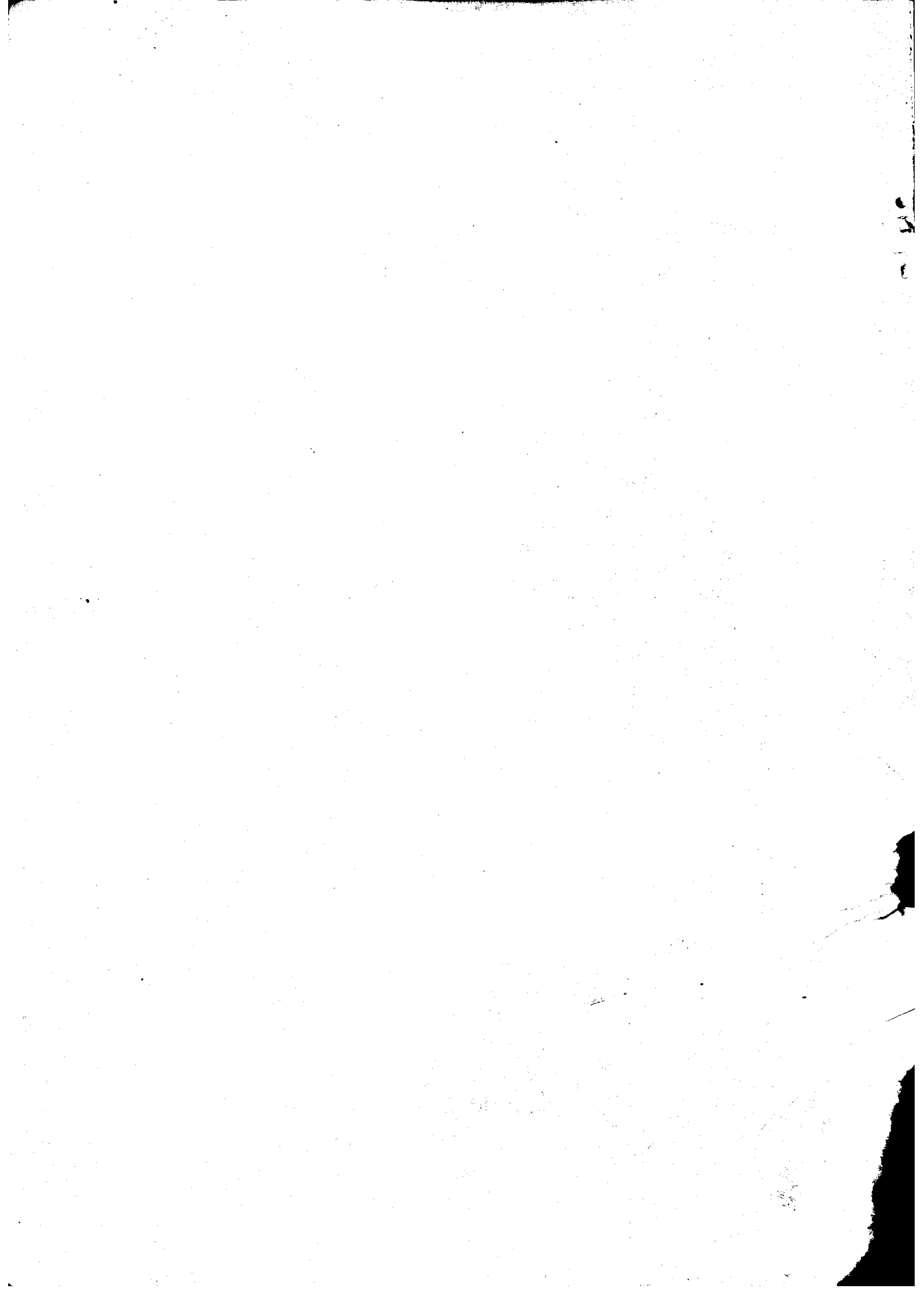
SHARP, J.A. (1977). *An Introduction to Animal Tissue Culture*. Studies in Biology, No. 82. Edward Arnold, London.

SHEPARD, J.F. (1982). The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts. *Scientific American*, 246 (pt. 5), 112–21.

SHEPARD, J.F., BIDNEY, D., BARSBY, T and KEMBLE, R. (1983). Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. *Science*, 219, 683–8.

WILLIAMSON, B. (1982). Gene therapy. *Nature*, 298, 416–18. (A thoughtful discussion of the medical implications of gene therapy.)

YELTON, D.E. and SCHARFF, M.D. (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annal Review of Biochemistry*, 50, 657–80.



مع تحيات لجنة المطبوعات بكلية الطب البيطري
جامعة القاهرة.